



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

MARIA PAULA MEDEIROS DA CUNHA SANTOS

**DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSSENSOR BASEADO EM PONTOS  
QUÂNTICOS DE GRAFENO E LECTINAS PARA DETECÇÃO DE  
MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS**

Recife  
2024

MARIA PAULA MEDEIROS DA CUNHA SANTOS

**DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSSENSOR BASEADO EM PONTOS  
QUÂNTICOS DE GRAFENO E LECTINAS PARA DETECÇÃO DE  
MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS**

Documento de qualificação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Inovação Terapêutica.

**Área de concentração:** Fármacos, medicamentos e insumos essenciais para a saúde.

**Orientadora:** Profa. Dra. Maria Danielly Lima de Oliveira

**Co-orientador:** Prof. Dr. César Augusto Souza de Andrade

Recife

2024

Santos, Maria Paula Medeiros da Cunha.

Desenvolvimento de um biossensor baseado em pontos quânticos de grafeno e lectinas para detecção de microrganismos patogênicos / Maria Paula Medeiros da Cunha Santos. - Recife, 2024.

151f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, 2024.

Orientação: Maria Danielly Lima de Oliveira.

Coorientação: César Augusto Souza de Andrade.

Inclui referências.

1. Concanavalina A; 2. Pontos quânticos; 3. Microrganismos; 4. Biossensor; 5. Espectroscopia de impedância. I. Oliveira, Maria Danielly Lima de. II. Andrade, César Augusto Souza de. III. Título.

UFPE-Biblioteca Central

MARIA PAULA MEDEIROS DA CUNHA SANTOS

**DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSSENSOR BASEADO  
EM NANOESTRUTURAS DE GRAFENO E LECTINAS PARA DETECÇÃO DE  
MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS**

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

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr<sup>a</sup> Maria Danielly Lima de Oliveira (Orientadora)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

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

---

Profa. Dr<sup>a</sup>. Michelly Cristiny Pereira (Examinadora Interna)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

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

A Deus todo poderoso, eu te  
glorifico e creio no teu poder.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela minha vida e da minha família. Além da permissão em me conceber coragem, discernimento e proteção divina. Sem Ele eu nada seria.

A minha eterna gratidão e amor aos meus orixás e guias espirituais.

A minha mãe e minha irmã por todo o apoio físico e emocional. Amo vocês mais que tudo.

Ao grande amor da minha vida, Maria Elis, minha filha. A razão de continuar e não desistir.

A Neto, meu amigo e parceiro de vida, pela ajuda e calma que foram essenciais.

As minhas amigas Babi e Arycia, pelas risadas e companheirismos de anos.

Aos meus orientadores, a Profa. Maria Danielly e o Prof. César Augusto, por todo o apoio, confiança, orientação e conhecimento compartilhado.

A todos do laboratório Biodispositivos Nanoestruturados (BioNano), pela ajuda, conselhos e alegrias nessa caminhada.

As cientistas e amigas que contribuíram muito na minha jornada, Karen Loraine, Léony e Beatriz, obrigada por tudo.

À Universidade Federal de Pernambuco e toda a sua equipe técnico-administrativa, que colaboraram para esta realização.

A FACEPE pelo apoio financeiro.

Sempre me rege, me  
guarde, me governe, me  
ilumine, amém.

# DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSSENSOR BASEADO EM PONTOS QUÂNTICOS DE GRAFENO E LECTINAS PARA DETECÇÃO DE MICRORGANISMOS PATOGENICOS

## Resumo

As infecções causadas por microrganismos são um problema de saúde pública, portanto ações como o desenvolvimento de novos sistemas de biodeteção são objetos de estudo para diagnosticar e tratar infecções. A espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) e a voltametria cíclica (CV) associadas a pontos quânticos de grafeno e filme de polipirrol possuem propriedades elétricas e químicas únicas, o que os tornam elementos importantes para aplicações de biossensor. Em adição, a lectina Concanavalina A (ConA) possui capacidade específica de ligação a carboidratos e se destaca por apresentar baixo custo quando comparada a outras biomoléculas receptoras. Propomos um biossensor baseado em pontos quânticos de grafeno conjugados com a lectina ConA e filme de polipirrol para detecção em tempo real e sem marcadores de *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *E. coli* e *S. aureus*. Modificamos PPY-QDGs com lectina ConA, com especificidade para glicose e manose, como biorreceptor. Os resultados mostraram que ConA possui a maior afinidade de ligação para *C. tropicalis* e *S. subtilis* mostrando capacidade de bioreconhecimento. O perfil de ligação do sistema PPY-GQDs-ConA, revelou resposta diferencial para *Candida spp.* (*C. tropicalis* > *C. albicans* > *C. glabrata*) e bacteriana (*B. subtilis* > *S. aureus* > *E. coli*), respectivamente. Para *Candida spp.*, os limites de detecção (LOD) obtidos foram de 1,42 UFC/mL para *C. albicans* e 3,72 UFC/mL para *C. glabrata*. O estudo de *C. tropicalis* produziu um LOD de 0,18 UFC/mL. Os respectivos LODs para as bactérias avaliadas foram 0,39 UFC/mL para *S. aureus*, 0,72 UFC/mL para *S. subtilis* e LOD de 2,63 UFC/mL para *E. coli*. O comportamento de resposta diferencial para ConA pode ser atribuído à distribuição heterogênea de carboidratos nas superfícies dos microrganismos. O novo sistema prova ser uma ferramenta miniaturizada em um substrato flexível inovador que pode contribuir para o diagnóstico microbiológico.

**Palavras-chave:** Concanavalina A; Pontos quânticos; Micoorganismos; Biossensor; Espectroscopia de impedância.

# DEVELOPMENT OF A BIOSENSOR BASED ON GRAPHENE QUANTUM DOTS AND LECTINS FOR DETECTION OF PATHOGENIC MICROORGANISMS

## Abstract

Infections caused by microorganisms are a public health problem, so actions such as the development of new biodetection systems are the aims to diagnose and treat infections. Electrochemical impedance spectroscopy (EIS) and cyclic voltammetry (CV) associated with graphene quantum dots and polypyrrole film have unique electrical and chemical properties, which make them important elements for biosensing applications. However, the lectin Concanavalin A (ConA) has specific binding capacity to carbohydrates and stands out for being low cost when compared to other receptor biomolecules. We propose a ConA-conjugated graphene quantum dots and polypyrrole film based biosensor for real-time and label-free detection of *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *E. coli* and *S. aureus*. We modified PPY-QDGs with lectin ConA, with glucose and mannose specificity, as bioreceptor. The results showed that ConA has the highest binding affinity for *C. tropicalis* and *S. subtilis* showing biorecognition capable. PPY-GQDs-ConA binding profile revealed differential response for *Candida* spp. (*C. tropicalis* > *C. albicans* > *C. glabrata*) and bacterial (*B. subtilis* > *S. aureus* > *E. coli*), respectively. For *Candida* spp., the limits of detection (LOD) obtained was 1.42 CFU/mL for *C. albicans* and 3.72 CFU/mL for *C. glabrata*. The study of *C. tropicalis* yielded an LOD of 0.18 CFU/mL. The respective LODs for the evaluated bacteria was 0.39 CFU/mL for *S. aureus*, 0.72 CFU/mL for *S. subtilis*, and LOD of 2.63 CFU/mL for *E. coli*. Differential response behavior for ConA can be attributed to the heterogenous distribution of carbohydrates on the microorganisms surfaces. The new system proves to be a miniaturized tool on an innovative flexible substrate that could contribute to microbiological diagnosis.

**Keywords:** Concanavalin A; Quantum dots; Microorganisms; Biosensor; Impedance spectroscopy.

## LISTA DE FIGURAS

|             |  |    |
|-------------|--|----|
| Figura 1 -  | Características da superfície celular da <i>Cândida albicans</i> . ....  | 24 |
| Figura 2 -  | Características morfológicas de <i>Cândida albicans</i> . Levedura, hifa e pseudohifas (a); Clamidósporo (b); Leveduras - comensalismo (c); Hifas e pseudohifas - doença superficial (d); leveduras, hifas e pseudohifas - doença disseminada (e). ....  | 26 |
| Figura 3 -  | Características morfológicas da <i>Cândida glabrata</i> . ....   | 28 |
| Figura 4 -  | Características morfológicas da <i>Cândida tropicalis</i> . ....   | 29 |
| Figura 5 -  | Composição do peptidoglicano. ....   | 31 |
| Figura 6 -  | Estrutura da parede celular de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. ....   | 32 |
| Figura 7 -  | Representação esquemática de um biossensor. O processo de detecção do analito (A) ocorre através da interação com o componente biológico (B) e está associado ao transdutor (C), que é responsável por converter essa interação bioquímica em um sinal mensurável (D). Esse sinal é então processado por um software computacional (E). e os dados resultantes são apresentados na forma de gráficos (F). .... | 43 |
| Figura 8 -  | Ilustração representativa dos diferentes tipos de biossensores. ....   | 44 |
| Figura 9 -  | Superfície do eletrodo modificado por lectina se comporta antes (a) e depois (b) da ligação..Esquema de uma célula eletroquímica convencional de três eletrodos utilizados para avaliação da superfície, sendo o contraeletrodo (CE) (1), eletrodo de trabalho (ET) (2) e o eletrodo de referência (ER) (3). ....  | 46 |
| Figura 10 - | Estruturas moleculares dos polímeros condutores. ....  | 47 |
| Figura 11 - | Representação química do grafeno e seus derivados óxido de grafeno, óxido de grafeno reduzido e o ponto quântico de grafeno ....   | 49 |
| Figura 12 - | Estrutura dimérica (a) e tetramérica (b) da concanavalina A..  | 51 |

|             |   |    |
|-------------|---|----|
| Figura 13-  | Superfície do eletrodo modificado por lectina se comporta antes (a) e depois (b) da ligação.....  | 52 |
| Figura 14 - | Representação da técnica de voltametria cíclica em uma reação reversível na superfície do eletrodo. Corrente de pico catódico ( $I_{pc}$ ); Corrente de pico anódico ( $I_{pa}$ ); Potencial de pico catódico ( $E_{pc}$ ); Potencial de pico anódico ( $E_{pa}$ ). ..... | 59 |
| Figura 15 - | Demonstração do circuito equivalente de Randles. Elementos: Cdl-capacitância da dupla camada elétrica; $Z_w$ - impedância de Warburg; $R_{ct}$ -resistência de transferência de carga e $R_s$ -resistência da solução.....  | 60 |
| Figura 16 - | Representação esquemática do diagrama de impedância de Nyquist. Relação entre a parte real ( $Z'$ ) e a parte imaginária ( $Z''$ ) da impedância em um sistema eletroquímico. ....  | 62 |
| Figura 17 - | Ilustração representativa da técnica de microscopia de força atômica .....  | 63 |
| Figura 18 - | Representação esquemática do biossensor. ....   | 67 |
| Figura 19 - | Microscopia de força atômica obtidas do eletrodo em ITO modificado por PPy (a), PPy-GQDs (b), PPy-GQDs-ConA (c), PPy-GQDs-ConA-BSA (d), PPy-GQDs-ConA-BSA-E.coli (e), PPy-GQDs-ConA-BSA-C.albicans (f).....   | 69 |
| Figura 20 - | Acompanhamento FTIR da fabricação da plataforma.....  | 71 |
| Figura 21 - | Voltametria Cíclica do PPy .....  | 72 |
| Figura 22 - | Estudo eletroquímico do tempo ideal para imobilização dos GQDs.....   | 73 |
| Figura 23 – | Voltamograma cíclico (a) e diagrama de Nyquist (b) da etapa de modificação do eletrodo através do sistema PPy-GQDs-ConA: Eletropolimerização do PPy (1), PPy-GQDs (2), PPy-GQDs-ConA (3), PPy-GQDs-ConA-BSA (4).....  | 74 |
| Figura 24 - | Voltamograma cíclico do sistema sensor, seguido pela resposta eletroquímica após entrar em contato com a <i>Candida albicans</i> (a), <i>Candida glabrata</i> (b) e <i>Candida tropicalis</i> (c) ( $10^1$ a $10^5$ UFC mL <sup>-1</sup> ) .....                          | 76 |

|             |   |    |
|-------------|---|----|
| Figura 25 - | Diagramas de Nyquist do sistema sensor, seguido pela resposta eletroquímica após entrar em contato com a <i>Candida albicans</i> (a), <i>Candida glabrata</i> (b) e <i>Candida tropicalis</i> (c) ( $10^1$ a $10^5$ UFC mL <sup>-1</sup> )..... | 79 |
| Figura 26 - | Relação entre a concentração das espécies de <i>Candidas</i> spp e o $\Delta R_{ct}$ no sensor PPy-GQDs-ConA-BSA. ....  | 83 |
| Figura 27 - | Grau de recobrimento do sistema sensor ( $\theta$ ) após exposição a espécies de <i>Cândida</i> spp ( $10^1$ - $10^5$ UFC mL <sup>-1</sup> ).....   | 84 |
| Figura 28 - | Voltamograma cíclico do sistema sensor, após o contato com as bactérias em diferentes concentrações ( $10^1$ a $10^5$ UFC mL <sup>-1</sup> ): <i>E. coli</i> (a); <i>S. aureus</i> (b) e <i>B. subtilis</i> (c).....                            | 86 |
| Figura 29 - | Diagramas de Nyquist do sistema sensor, seguido pela resposta eletroquímica após entrar em contato com a <i>E. coli</i> (a), <i>S. aureus</i> (b) e <i>B.subtilis</i> (c) ( $10^1$ a $10^5$ UFC mL <sup>-1</sup> ).....                         | 88 |
| Figura 30 - | $\Delta R_{ct}$ do sensor PPy-GQDs-ConA-BSA após ser submetido a diferentes concentrações bacterianas.....  | 92 |
| Figura 31 - | Grau de recobrimento do sistema sensor ( $\theta$ ) após exposição as bactérias gram -/+ em diferentes concentrações ( $10^1$ - $10^5$ UFC mL <sup>-1</sup> ).....  | 93 |

## LISTA DE TABELAS

|            |   |    |
|------------|---|----|
| Tabela 1 - | Principais características de infecções pela espécie de <i>Cândida</i> spp.....   | 27 |
| Tabela 2 - | Vantagens e desvantagens dos métodos convencionais para a identificação das espécies de <i>Cândida</i> spp. e bactérias gram positivas e negativas.....                               | 38 |
| Tabela 3 - | Corrente relativa ( $\Delta I$ ) do sistema biossensor após a interação com as cândidas em diferentes concentrações ( $10^1$ a $10^5$ UFC mL <sup>-1</sup> ).....                     | 78 |
| Tabela 4 - | Elementos do circuito equivalente obtidos a partir da impedância elétrica. ....   | 82 |
| Tabela 5 - | Corrente relativa ( $\Delta I\%$ ) do biossensor após a interação com bactérias gram-positivas e negativas em diferentes concentrações ( $10^1$ a $10^5$ UFC mL <sup>-1</sup> ). .... | 88 |
| Tabela 6 - | Valores dos elementos de circuito equivalente dos resultados de impedância elétrica. ....   | 91 |
| Tabela 7 - | Plataformas biossensoras que consistem na utilização da concanavalina A, seus microrganismos alvo e os limites de detecção correspondentes.....                                       | 94 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                 |  |
|-----------------|--|
| AFM             | Microscopia de Força Atômica                 |
| ConA            | Concanavalina A                              |
| cm              | Centímetro                                   |
| BSA             | Albumina do Soro Bovino                      |
| EDC             | 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida |
| EIE             | Espectroscopia de Impedância Eletroquímica   |
| Eq.             | Equação                                      |
| ER              | Eletrodo de Referência                       |
| ET              | Eletrodo de Trabalho                         |
| Fig             | Figura                                       |
| GQDs            | Pontos quânticos de grafeno                  |
| HIV             | Vírus da Imunodeficiência Adquirida          |
| IE              | Impedância Elétrica                          |
| IH              | Infecção Hospitalar                          |
| IRAS            | Infecção relacionada à assistência da saúde  |
| ITU             | Infecções do Trato Urinário                  |
| L               | Litros                                       |
| LPS             | Lipopolissacarídeo                           |
| M               | Mol  |
| mL              | Mililitro                                    |
| NHS             | N-Hidroxisuccinimida                         |
| nm              | Nanômetros                                   |
| OMS             | Organização Mundial da Saúde                 |
| PCR             | Reação em cadeia de Polimerase               |
| PPy             | Polipirrol                                   |
| pH              | Potencial Hidrogeniônico                     |
| UFC             | Unidades formadoras de colônia               |
| UTI             | Unidade de Terapia Intensiva                 |
| VC              | Voltametria Cíclica                          |
| Cdl             | Capacitância da dupla camada elétrica        |
| I <sub>pa</sub> | Corrente de pico anódica                     |
| I <sub>pc</sub> | Corrente de pico catódica                    |

|                 |                                      |
|-----------------|--------------------------------------|
| $R_{ct}$        | Resistência à transferência de carga |
| $R_s$           | Resistência da solução               |
| $Z_w$           | Impedância de Warburg                |
| %               | Porcentagem                          |
| $R\Omega$       | Resistência da Solução               |
| $Z'$            | Eixo Real da Impedância              |
| $Z''$           | Eixo Imaginário da Impedância        |
| $ Z $           | Módulo da Impedância                 |
| $\omega$        | Frequência angular                   |
| $\Delta I$      | Variação de corrente                 |
| $\Delta R_{ct}$ | Variação Relativa do $R_{ct}$        |
| $\theta$        | Grau de Revestimento de Superfície   |

## SUMÁRIO

|              |   |           |
|--------------|---|-----------|
| <b>1.</b>    | <b>Introdução.....</b>  | <b>18</b> |
| <b>2.</b>    | <b>Objetivos .....</b>  | <b>20</b> |
| 2.1          | Objetivo geral .....  | 20        |
| 2.2          | Objetivo específico .....   | 20        |
| <b>3.</b>    | <b>Referencial teórico .....</b>                                  | <b>21</b> |
| 3.1          | Infecção hospitalar .....   | 21        |
| 3.2          | Principais microorganismos relacionados a IRAS .....              | 22        |
| 3.2.1        | <i>Candida spp</i> .....  | 23        |
| <b>3.2.2</b> | <b>Bactérias .....</b>  | <b>30</b> |
| 3.3          | Métodos convencionais de diagnóstico .....                        | 37        |
| 3.4          | Biossensores .....  | 41        |
| 3.4.1        | Polímeros Condutores .....  | 46        |
| 3.4.2        | Pontos Quânticos .....  | 48        |
| 3.4.3        | Biossensores eletroquímicos baseados em lectinas .....            | 51        |
| 3.5          | Técnicas de Caracterização .....                                  | 55        |
| 3.5.1        | Voltametria Cíclica (VC) .....                                    | 56        |
| 3.5.2        | Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE) .....            | 59        |
| 3.5.3        | Microscopia de Força Atômica .....                                | 63        |
| 3.5.4        | Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier ..... | 64        |
| <b>4.</b>    | <b>Materiais e Métodos .....</b>                                  | <b>66</b> |
| 4.1          | Materiais .....   | 66        |
| 4.2          | Montagem do sistema sensor PPy-GQD-Lectina .....                  | 66        |
| 4.3          | Medidas de impedância eletroquímica .....                         | 67        |
| 4.4          | Microscopia de força atômica .....                                | 68        |
| 4.5          | Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier ..    | 68        |
| <b>5.</b>    | <b>Resultados e discussão .....</b>                               | <b>69</b> |
| 5.1          | Análise topográfica .....   | 69        |
| 5.2          | Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier ..    | 70        |
| 5.3          | Caracterização eletroquímica .....                                | 72        |
| 5.3.1        | Padronização de Eletropolimerização e Nanoestruturação .....      | 72        |
| 5.3.2        | Caracterização do biossensor PPy-GQDs-ConA-BSA .....              | 73        |

|     |   |            |
|-----|---|------------|
| 5.4 | Caracterização eletroquímica da detecção das espécies de <i>Cândida spp</i> pelo biossensor PPy- GQDs-ConA-BSA .....                              | 76         |
| 5.5 | Caracterização eletroquímica da detecção de bactérias pelo biossensor PPy-GQDs-ConA-BSA .....   | 85         |
| 6.  | <b>Conclusão .....</b>  | <b>98</b>  |
| 7.  | <b>Perspectivas .....</b>   | <b>99</b>  |
| 8.  | <b>Referências .....</b>  | <b>99</b>  |
| 9.  | <b>ARTIGO 1 – NEW BIOELECTRODE BASED ON GRAPHENE QUANTUM DOTS-POLYPYRROLE FILM AND CONCAVALIN A FOR PATHOGENIC MICROORGANISMS DETECTION .....</b> | <b>119</b> |
|     | <b>ARTIGO A SER SUBMETIDO NA REVISTA “<i>Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis</i>” .....</b>   | <b>119</b> |

## 1. Introdução

As Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) representam um desafio significativo para a saúde pública, uma vez que elas não apenas prolongam o tempo de internação dos pacientes, mas também resultam em aumentos nos custos do tratamento. Além disso, essas infecções contribuem para o desenvolvimento da resistência microbiana, tornando os tratamentos mais difíceis. Isso, por sua vez, está associado a taxas mais elevadas de morbimortalidade, o que tem um impacto negativo não apenas na qualidade dos cuidados de saúde prestados, mas também na segurança dos pacientes (World Health Organization, 2021). Isso inclui uma variedade de microrganismos, como bactérias, vírus, protozoários, fungos e helmintos (Khan et al., 2019).

A resistência crescente de alguns patógenos a medicamentos antimicrobianos é uma preocupação cada vez mais relevante, especialmente em ambientes de cuidados de saúde, onde os pacientes estão expostos a Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (Esposito et al., 2017). A automação e o diagnóstico rápido de patógenos como fungos e bactérias são facilitados pela nanotecnologia, especialmente na criação de biossensores. Esses dispositivos portáteis e flexíveis são projetados para uso direto em ambientes hospitalares, permitindo uma integração eficaz na rotina dos profissionais de saúde. Essa abordagem inovadora resulta na criação de novos dispositivos e aplicações que têm um impacto significativo na melhoria da saúde dos pacientes (Godoy, 2021).

Diferentes métodos de diagnóstico de microrganismos, como cultura microbiológica, testes sorológicos e moleculares, são padrões na área, mas têm limitações, como tempo de resposta prolongado e custo elevado. Testes sorológicos, como ELISA, podem ser sensíveis para identificar *Candida*, mas têm risco de reações cruzadas. Já o PCR e análises moleculares são confiáveis, porém caros e exigem especialistas (Villamizar et al., 2009; Lauri et al., 2009).

Os polímeros condutores, especialmente o PPy, são valorizados em plataformas sensoras devido à sua condutividade elevada, rápida transferência de elétrons, capacidade de armazenamento de carga, reversibilidade em reações redox e compatibilidade biológica. Essas características contribuem

para a eficácia e robustez dos biossensores, melhorando o desempenho nos sistemas de detecção biológica (Dakshayini et al., 2019; Jain et al., 2017).

Adicionalmente, destaca-se o papel do grafeno, um nanomaterial empregado em eletrodos, devido à sua capacidade de facilitar reações de transferência de elétrons. Nesse contexto, a conjugação de proteínas ou enzimas redox a materiais à base de grafeno promove avanços na detecção, impulsionando o progresso dos biossensores eletroquímicos (Gan e Hu, 2011; Kuila et al., 2011). Em suma, os materiais de grafeno, que possui uma estrutura plana composta por átomos de carbono dispostos em uma configuração semelhante a um favo de mel, e essa estrutura possui propriedades que exibem fotoluminescência ajustável, excelente biocompatibilidade e baixa citotoxicidade em comparação com moléculas de corante fluorescente tradicionais e proteínas fluorescentes (Xie et al., 2016; Liu et al., 2012; Xiang et al., 2012).

As lectinas são proteínas especializadas em reconhecer e se ligar a determinados carboidratos, sendo úteis no reconhecimento biológico em biossensores. Um exemplo é a concanavalina A (ConA), amplamente utilizada em aplicações biomédicas e biotecnológicas devido à sua estrutura e propriedades de ligação a carboidratos (Coulibaly; Youan, 2014). ConA possui especificidade na interação com carboidratos como Glucose (Glc) e Manose (Man), encontrados na parede celular de bactérias e fungos (Gautam et al., 2020; Masuoka, 2004; Lopez-Tellez et al., 2020; Mi et al., 2021).

Diante do exposto, o trabalho elaborado desenvolveu um biossensor para a detecção de espécies de candidas e bactérias patogênicas, com o objetivo de fornecer especificidade e otimização no processo de detecção. O estudo se concentrou na interação da lectina ConA na superfície do sistema PPy-GQD, visando o reconhecimento e detecção de espécies específicas de Candida e diferentes bactérias de interesse clínico. O sistema PPy-GQD-ConA foi aplicado na detecção de amostras com patógenos clinicamente relevantes, proporcionando a diferenciação e identificação das espécies através do reconhecimento sacarídico sítio-específico.

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo geral

Desenvolvimento de um biodispositivo nanoestruturados baseada em lectina e pontos quânticos para a identificação/diferenciação de bactérias e do fungo *Candida spp* através das técnicas eletroquímica e análise topográfica.

### 2.2 Objetivo específico

- Avaliação físico-química dos parâmetros relacionados às etapas de modificação da superfície do eletrodo em ITO (Óxido de índio dopado com estanho);
- Determinação das propriedades bioeletroquímicas modificadas na plataforma PPy- GQD-Lectinas por meio da VC e EIE;
- Avaliação dos fenômenos interfaciais dos sistemas PPy-GQD-Lectinas e sua utilização para fabricação de biodispositivos;
- Avaliação da sensibilidade e limite de detecção do sistema sensor;
- Avaliação da estabilidade e reprodutibilidade do sistema sensor;
- Determinação das correntes de pico anódicas (ipa) e catódicas (ipc) por meio da VC;
- Caracterização dos sistemas biossensíveis através da espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) e avaliação teórica da capacitância da dupla camada elétrica (Cdl); elemento de fase constante (CPE/Q); resistência à transferência de carga (Rct) através de circuitos equivalentes de Randles;
- Caracterização morfológica e estrutural das interações através da AFM e FTIR.

### 3. Referencial teórico

#### 3.1 Infecção hospitalar

A Infecção Hospitalar (IH) representa um significativo desafio na esfera da saúde e segurança do paciente. Conforme definido pelo Ministério da Saúde, refere-se a qualquer infecção contraída após a internação, durante a permanência no hospital, ou mesmo após a alta, estando associada à internação ou aos procedimentos hospitalares (Sena et al., 2022).

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o termo "Infecção Hospitalar" não é mais utilizado, sendo substituído pelo conceito de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Essa atualização engloba qualquer local que ofereça serviços de saúde, não se limitando apenas a ambientes hospitalares. O objetivo é abranger uma perspectiva mais ampla e inclusiva em relação às infecções associadas aos cuidados de saúde (Hespanhol et al., 2019).

Nesse contexto, as Unidades de Terapia Intensiva são ambientes propícios à presença de agentes patogênicos. De acordo com Mota e colaboradores, aproximadamente 30% das infecções nosocomiais ocorrem nesses ambientes (Mota et al., 2018). Os pacientes que necessitam de suporte em Unidades de Terapia Intensiva estão suscetíveis a adquirir infecções durante o período de internação, apesar da organização dessas unidades. Além disso, pacientes que idade avançada, déficit imunológico, estado nutricional, tabagismo e tempo de internação, são indicadores de vulnerabilidade para o surgimento das IRAS, que são comumente observadas no contexto das UTIs (Carioca et al., 2019).

Os efeitos resultantes de eventos adversos provenientes das IRAS têm um impacto significativo nos altos índices de doença e morte entre os pacientes internados em UTI. Isso também tem um impacto econômico e social na vida da população, aumentando os custos financeiros dos sistemas de saúde devido ao prolongamento da hospitalização e favorecendo a disseminação de microrganismos multirresistentes na comunidade. Consequentemente, esse cenário é considerado um sério problema de saúde pública (Araújo et al., 2018).

No Brasil, são adotadas várias medidas com o objetivo de prevenir, detectar e controlar precocemente a disseminação de eventos adversos

decorrentes IRAS em pacientes internados em UTIs. Atualmente, os hospitais contam com a Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) e outros núcleos governamentais, para a criação de programas de vigilância e a implementação da Política Nacional de Segurança do Paciente (PNSP). Essas iniciativas visam qualificar os cuidados prestados aos pacientes e promover a segurança em ambientes de saúde (Anvisa, 2017).

### 3.2 Principais microorganismos relacionados a IRAS.

As infecções relacionadas à assistência em saúde podem ser causadas por uma grande diversidade de patógenos, e essa variedade varia de acordo com a região, a população atendida, os diferentes sistemas de saúde e as instalações médicas de cada país. Bactérias, fungos, vírus e alguns parasitas estão entre os principais organismos patogênicos associados a tais infecções (Ducel et al., 2002; Souto et al., 2023).

Infecções causadas por fungos do gênero *Candida* representam aproximadamente 80% das infecções fúngicas registradas em ambientes hospitalares. No Brasil, o gênero *Candida* foi identificado como o sétimo agente etiológico mais comum de infecções sanguíneas. A espécie mais prevalente nesse contexto é a *C. albicans*, responsável por 34,3% das infecções, seguida pela *C. parapsilosis* (24,1%), *C. tropicalis* (15,3%) e *C. glabrata* (10,2%). É importante notar que essas infecções apresentam uma taxa de mortalidade significativa, atingindo 72,2% (Rocha, 2021).

As bactérias multirresistentes, como *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae*, estão frequentemente associadas a infecções relacionadas à assistência em saúde (Darvishi et al., 2020). Em particular, as bactérias gram-negativas demonstram resistência a uma ampla variedade de medicamentos usados em ambiente hospitalar, onde variam de 9% a 38%, podendo alcançar 60% a taxas de mortalidade (Silva et al., 2021).

No Boletim de Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde número 17, divulgado pela ANVISA em 2017 no Brasil, foram destacados os principais microrganismos resistentes associados a Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde em diferentes unidades de terapia intensiva, sendo na UTI

adulto, a bactéria gram-negativa *Acinetobacter spp.* resistente aos carbapenêmicos foi a mais prevalente, com uma taxa de 77,7% de resistência, seguida pelo coco gram-positivo *Staphylococcus Coagulase Negativo* (SCoN) resistente à oxacilina, que apresentou uma taxa de resistência de 72,2% (Anvisa, 2017).

Em UTI pediátrica, as taxas mais altas de resistência foram observadas em SCoN resistente à oxacilina, atingindo 73,4%, seguidas por *Acinetobacter spp.* resistente aos carbapenêmicos, com 48,6% de resistência. Já na UTI neonatal, as taxas de resistência mais elevadas foram relatadas para SCoN resistente à oxacilina, com 78,4% de resistência, e *Pseudomonas aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos, que apresentou uma taxa de resistência de 43,5. Esses dados destacam a importância da vigilância e do controle de infecções hospitalares, especialmente em UTIs, devido à alta prevalência de microrganismos resistentes, o que representa um desafio significativo para a segurança do paciente e a qualidade dos serviços de saúde (ANVISA, 2017a).

### 3.2.1 *Candida spp*

Os fungos se destacam como um dos maiores reinos eucariontes, apresentando uma diversidade de padrões ciclos de vida, acompanhada por adaptações intrincadas no metabolismo e na morfogênese, o que possibilita que esses microrganismos se ajustem de maneira eficaz as constantes mudanças nos ecossistemas (Choi, 2017).

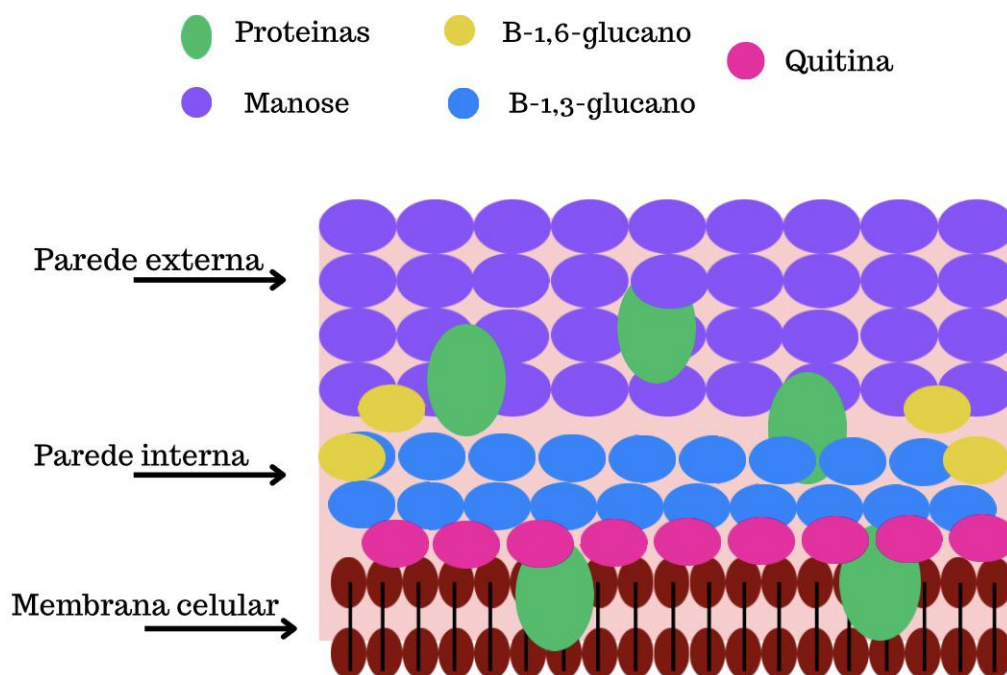
Com isso, as espécies de *Candida spp* macroscopicamente são caracterizadas por uma consistência cremosa, podendo variar em brilho de opaco a brilhante, com uma coloração que geralmente varia de branco a creme, mas ocasionalmente pode apresentar tons de marfim a vermelho (Gorthi, 2019).

Essas espécies geralmente têm um diâmetro variando de 3 a 5  $\mu\text{m}$ , sendo células simples, arredondadas, ovais ou alongadas, e possuem uma parede celular fina. A reprodução ocorre principalmente por brotamento, geralmente na região polar da célula-mãe, onde se forma uma gêmula conhecida como blastoconídio (Naves, 2013; Nins, 2023). Uma vez liberados, esses blastoconídios podem se tornar células independentes ou permanecerem ligados, formando células alongadas chamadas pseudo-hifas. É importante notar

que essas pseudo-hifas têm diferenças em relação às verdadeiras hifas, incluindo constrições nos septos, que são as divisões entre as células (Silva et al., 2020).

A composição das espécies de *Candida spp* consta, proteínas e carboidratos, como demonstrado na fig. 1, sendo respectivamente, 10% e 90% localizados na parede celular. O grupo de carboidratos apresenta polímeros de manose ligados a oxigênio/nitrogênio, D-glucanos e quitina. Disto isso, a estrutura molecular pode interligar-se com células hospedeiras pela sua superfície e reconhecimento imunológico (Gow e Hube, 2012).

**Figura 1** - Características da superfície celular da *C. albicans*.



Fonte: Canva por próprio autor.

As infecções causadas pelo gênero *Candida* são conhecidas como candidíase, uma condição fúngica multifacetada que pode incluir infecções na pele e mucosas, bem como infecções viscerais e disseminadas. Essa variedade de infecções ocorre devido a um desequilíbrio entre o fungo *Candida*, as mucosas do corpo e os mecanismos de defesa do hospedeiro (Silva et al., 2021).

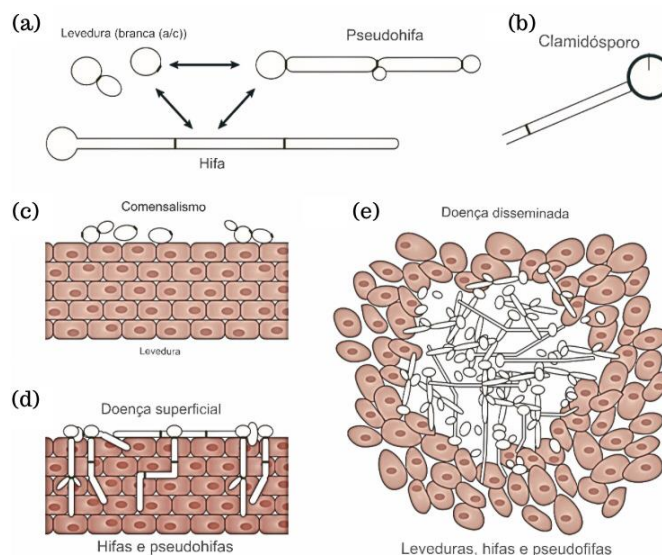
Esse desequilíbrio beneficia a transição do fungo *Candida* de um estado comensal, onde coexiste normalmente com o hospedeiro, para um estado patogênico, onde pode causar infecções. É importante observar que, em condições normais, o gênero *Candida* faz parte da microbiota normal do ser humano (Ribeiro et al., 2019).

Existem cerca de 200 espécies de *Candida*, com 90% dos casos de candidemia ligados às cinco mais comuns: *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei*. Vários fatores, como uso de antibióticos amplo espectro, hospitalização prolongada e presença de cateter venoso central, estão associados ao desenvolvimento da candidemia. Elementos adicionais que aumentam o risco incluem idade extrema, imunossupressão, insuficiência renal e tratamentos como quimioterapia (Silva, 2017)

No contexto do gênero *Candida*, um dos principais fatores de virulência é a formação de biofilme, e as adesinas nesse processo, facilitam a aderência e a colonização. Além disso, barreiras protetoras das células hospedeiras incluem a membrana e a parede celular, sendo hidrolases associadas por desempenham a quebrar essas barreiras, permitindo que o microrganismo interaja e invada o hospedeiro (Staniszewska,, 2020).

De acordo com Wang et al. (2021), o *C. albicans* apresenta uma variedade de formas morfológicas e fenótipos devido à sua característica dimórfica (Wang et al., 2021) Como demonstrado na fig. 2, (a) a *Candida albicans* tem a capacidade de alternar entre diversos tipos celulares, como leveduras, hifas e pseudohifas, dependendo das condições ambientais. Em (b), sendo apresentado situações de crescimento, como na produção de clamidósporos que ocorre nas células terminais, ou suspensoras, dos micélios, que podem ser hifas multicelulares ou pseudohifas. Os modelos de infecção mucocutânea, representados por (c) e (d), mostram que as leveduras estão ligadas ao comensalismo na candidíase orofaríngea (parte c), enquanto as formas filamentosas (hifas e pseudo-hifas) estão associadas à invasão e dano tecidual (parte d). Em (e), as leveduras, hifas e pseudohifas desempenham papéis na doença disseminada, como em abscessos nos órgãos internos do hospedeiro (Noble et al., 2016).

**Figura 2** - Características morfológicas do fungo *C. albicans*. Levedura, hifa e pseudohifas (a); Clamidósporo (b); Leveduras - comensalismo (c); Hifas e pseudohifas - doença superficial (d); leveduras, hifas e pseudohifas - doença disseminada (e).



Fonte: Adaptado de Noble et al., 2016.

A identificação que a seleção imunológica mediada por IgA intestinal contra os filamentos da *C. albicans* suprime os fatores prejudiciais do fungo, ao mesmo tempo em que melhora a aptidão competitiva da *C. albicans* na forma de fermento, permitindo assim que ela coexista como comensal (Ost et al., 2021).

Como demonstrado na Tabela 1, dentro do intestino, o fungo *C. albicans* desempenha um papel na modulação da composição da microbiota saudável, inibindo o crescimento de vários gêneros dominantes de bactérias intestinais e reduzindo a inflamação local (Rao et al., 2021; Kawakita et al., 2021). A presença da *C. albicans* no intestino está associada a um aumento nas células B produtoras de IgG no baço e a uma produção sistêmica de IgG antifúngica, proporcionando proteção contra a candidemia (Doron et al., 2021; Bacher et al., 2019; Shao et al., 2019). Em estudos com ratos, a *C. albicans* submetida a múltiplas passagens resultou na adaptação do fungo à colonização e proporcionou uma melhor proteção contra infecções subsequentes de maneira independente dos linfócitos (Tso et al., 2018).

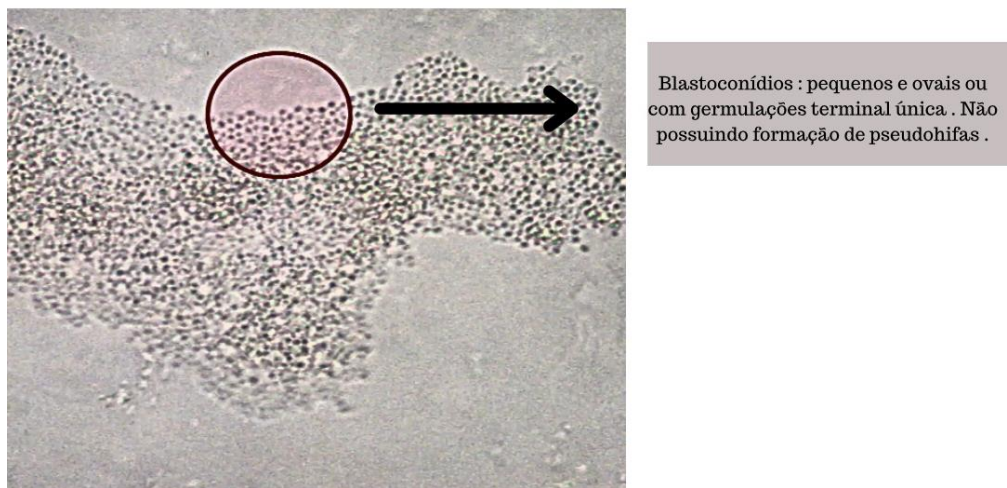
**Tabela 1** - Principais características de infecções pelas espécies de *Cândida* spp.

| <b>Espécies</b>           | <b>Características da infecção</b>                                 | <b>Diagnóstico</b>  |
|---------------------------|--|---|
| <i>Cândida albicans</i>   | Infecção mucocutâneas (orofaringe, vaginite e esofaringe).         | Cultura Microbiológica; Reação em Cadeia da Polimerase (PCR); Ensaio imunoabsorvente Ligado a enzima (ELISA). |
| <i>Cândida tropicalis</i> | Candidemia, candidíase sistêmica em pacientes com imunidade baixa. | Cultura Microbiológica; Reação em Cadeia da Polimerase (PCR); Ensaio imunoabsorvente Ligado a enzima (ELISA). |
| <i>Cândida glabrata</i>   | Candidíase sistêmica, candidemia, infecção no trato urinário.      | Cultura Microbiológica; Reação em Cadeia da Polimerase (PCR); Ensaio imunoabsorvente Ligado a enzima (ELISA). |
| <i>Cândida krusei</i>     | Candidemia, endoftalmite, infecção intestinal em recém nascidos.   | Cultura Microbiológica; Reação em Cadeia da Polimerase (PCR); Ensaio imunoabsorvente Ligado a enzima (ELISA). |

Fonte: Próprio autor.

Como demonstrado na figura 3, esse fungo é naturalmente encontrado nas mucosas do corpo humano, afetando tanto pessoas saudáveis quanto aquelas com sistemas imunológicos enfraquecidos (Rocha et al., 2018).

**Figura 3** - Características morfológicas do fungo *C. glabrata*.



Fonte: adaptação Almeida et al., 2012.

O elevado aumento nas infecções por fungos, particularmente em ambientes hospitalares, está diretamente relacionado ao uso extensivo de antifúngicos. No caso específico da *C. glabrata*, a exposição prévia a medicamentos antifúngicos da classe dos azólicos desempenha um papel decisivo nesse aumento. Isso levou a *C. glabrata* a se tornar um dos principais patógenos em casos de candidíase, frequentemente classificando-se como o terceiro agente mais comum em infecções fúngicas, principalmente em contextos hospitalares (Cardoso, 2020).

Quanto à atividade de fosfolipase, a *C. glabrata* demonstra um nível muito baixo. Em uma árvore filogenética, ela ocupa uma posição única e possui características que a tornam capaz de estabelecer infecções bem-sucedidas em seres humanos. Como demonstrado na figura 4, é importante destacar que, em comparação com a *C. albicans*, a *C. glabrata* é significativamente menos patogênica. Isso pode ser atribuído à falta de formas invasivas de hifas, atividade proteolítica secretada, invasinas e à sua limitada plasticidade de nutrientes,

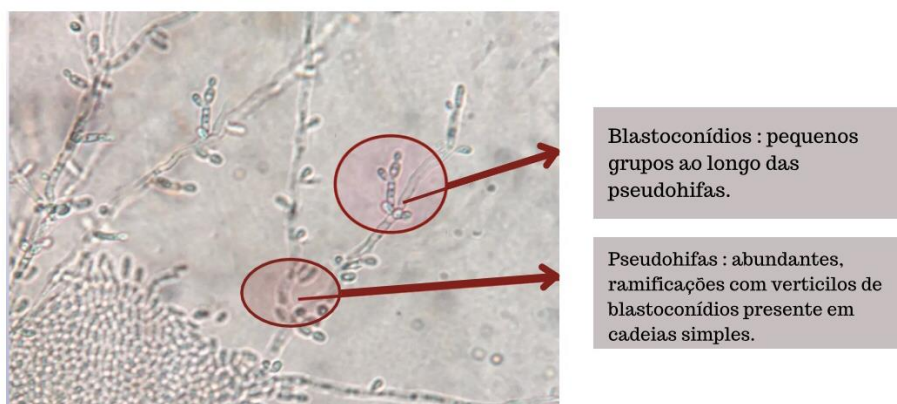
incluindo a incapacidade de utilizar hemoglobina como fonte de ferro (Carvalho et al., 2017).

Esses fatores provavelmente contribuem para a menor patogenicidade do fungo *C. glabrata*. Pesquisas realizadas nas últimas duas décadas revelaram várias características biológicas surpreendentes da *Candida glabrata*. Devido à sua resistência reduzida aos antifúngicos azólicos e à emergência de resistência às equinocandinas, o tratamento eficaz de infecções causadas pela *Candida glabrata* continua sendo um desafio clínico (Kumar et al., 2019).

Inicialmente, *C. tropicalis* foi identificada como a espécie mais prevalente entre as demais. Devido ao aumento significativo de infecções por esta espécie em todo o mundo e ao seu histórico como a principal causadora de candidíase em pacientes tanto imunocomprometidos quanto imunocompetentes. Sendo associada a diversas infecções, incluindo aquelas que afetam o trato gastrointestinal, candidíase mucocutânea crônica, candidemia nosocomial, entre outras (Kothavade et al., 2010).

As infecções causadas por *Candida tropicalis* são frequentemente associadas a condições malignas, e estudos destacam sua alta incidência entre pacientes com doenças hematológicas, como a leucemia mieloide aguda. Infelizmente, a mortalidade ligada à candidemia por *C. tropicalis* nessas populações varia consideravelmente, com taxas que podem oscilar entre 30% e 70%, com números mais altos entre os indivíduos idosos (Rocha et al., 2017).

**Figura 4 - Características morfológicas do fungo *C. tropicalis*.**



Fonte: Adaptação Almeida et al., 2012.

O estudo conduzido por Wu e sua equipe em 2019 destaca que *C. tropicalis* é frequentemente encontrada como um microrganismo comensal em superfícies mucosas, na cavidade oral e em algumas áreas da pele (Wu et al., 2019). Os surtos do fungo *C. tropicalis* descritos em 1989 e em situações posteriores ressaltam a importância da vigilância e do controle de infecções em ambientes de saúde. O primeiro surto, envolvendo pacientes pós-operatórios de revascularização do miocárdio, sendo apontados os próprios funcionários de saúde como a fonte de disseminação da infecção (Barac et al., 2020).

A *C. krusei* é um fungo patogênico notável devido à sua capacidade de causar candidíase invasiva. Uma característica notável desse fungo é sua resistência natural ao fluconazol, um medicamento antifúngico (Gong et al., 2018). *C. krusei* pertence ao gênero *Candida* e suas células maiores têm forma cilíndrica, chegando a até 25 µm de comprimento. Esse fungo é considerado um patógeno hospitalar, afetando principalmente pacientes imunossuprimidos e aqueles com neoplasias hematológicas (Lara e Gil; 2017).

De acordo com Navarro-Arias e colaboradores, 2019, a *C. krusei* é considerada parte de um grupo emergente de espécies de *Candida* associadas à candidíase sistêmica, contribuindo como agente causador em 2-5% dos casos relatados. Uma diferença notável entre as infecções causadas por *C. guilliermondii* e *C. krusei* é a taxa de mortalidade, que é mais elevada no caso de *C. krusei* (20-67%). Isso está possivelmente relacionado à sua baixa resposta aos antifúngicos padrões (Navarro-Arias et al., 2019).

### 3.2.2 Bactérias

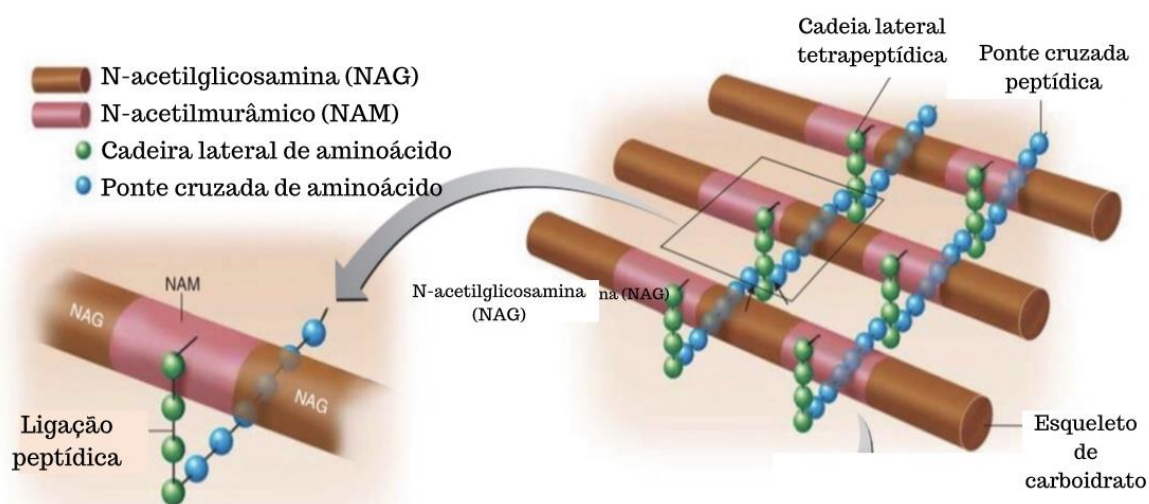
As infecções provocadas por bactérias resistentes têm crescido significativamente nos últimos anos, devido à utilização indiscriminada de medicamentos. Essas infecções se tornaram uma importante fonte de morbidade e mortalidade global, inclusive em nações desenvolvidas (Guevara Agudelo et al., 2020).

Dito isso, as bactérias são microrganismos constituídos por uma única célula, com um comprimento de 2 a 5 µm e podem viver isoladamente ou formar colônias. Diferentemente das células de organismos mais complexos, o material genético das bactérias está disperso no citoplasma, tornando-as procariontes.

Elas são conhecidas por serem extremófilas, o que significa que têm a capacidade de se adaptar a uma ampla variedade de ambientes e desempenham um papel importante na decomposição de matéria orgânica, assim como, podem sofrer mutações com frequência (Teixeira, 2020).

A parede celular bacteriana possui uma estrutura que apresenta uma espessura que varia de 10 a 100 nanômetros e correspondendo a cerca de 10 a 40% do peso total da célula bacteriana. Constituída principalmente por uma rede macromolecular de peptidoglicano, sendo composta por um polímero rígido e insolúvel formado por N-acetilglicosamina, ácido N-acetilmurâmico e peptídeo, possui a função de fornecer proteção e suporte estrutural à célula bacteriana, como demonstrado na fig. 5 (Nogueira e Filho, 2015).

**Figura 5** - Composição do peptideoglicano.

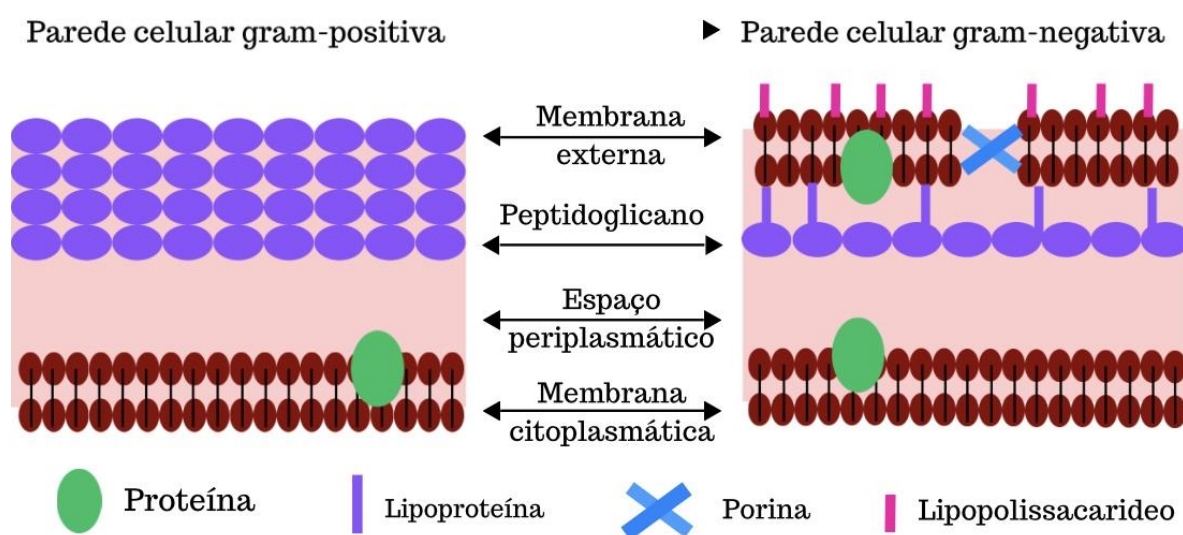


Fonte: Adaptado de Tortora, G.; Funke, B.; Case, C. 13º Ed. 2019.

A coloração de Gram desempenha um papel fundamental na caracterização e classificação inicial das bactérias. Esse método de coloração é crucial, pois viabiliza a visualização das bactérias no microscópio óptico, já que sem a coloração é praticamente impossível observá-las ou identificar sua estrutura (Teixeira, 2020).

O dinamarquês Hans Christian Gram em 1884 desenvolveu a coloração de Gram, como um método reconhecido por identificar as bactérias em dois grupos distintos: Gram-positivas e Gram-negativas. Devido às variações estruturais nas paredes celulares dessas bactérias, respostas diferentes são observadas através da coloração de Gram, que afetam a capacidade de reter ou liberar a combinação de cristal violeta e iodo, conhecida como complexo cristal violeta-iodo. Como demonstrado na figura 6, entre as diferenças observadas, as bactérias Gram-positivas possuem uma parede celular de peptidoglicano mais espessa, composta por dissacarídeos e aminoácidos, em comparação com as bactérias Gram-negativas. Adicionalmente, as bactérias Gram-negativas contêm uma camada de lipopolissacarídeo, composta por lipídios e polissacarídeos, como parte de sua parede celular (Tortora e Filho, 2017).

**Figura 6** - Estrutura da parede celular de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas.



Fonte: Canva por próprio autor.

As bactérias Gram-negativas, da família Enterobacteriaceae, como a *Escherichia coli* possuem uma estrutura de parede celular caracterizada por uma camada fina de peptidoglicanos revestida por uma membrana externa rica em

lipopolissacarídeos. Essa membrana externa contém proteínas chamadas porinas, que facilitam a difusão passiva através da membrana (Maranni, 2023).

O lipopolissacarídeo é considerado uma endotoxina, e sua porção lipídica é responsável por suas propriedades tóxicas. Durante infecções bacterianas, fragmentos dessa endotoxina podem ser liberados e desencadear manifestações clínicas semelhantes às causadas por choques endotóxicos (Duarte, 2011).

As bactérias Gram-positivas, como *Staphylococcus* sp. e *Enterococcus* sp., juntamente com estreptococos beta-hemolíticos, são responsáveis por uma variedade de infecções, incluindo infecções pulmonares, ósseas, endocárdicas e bacteremias (Calfee et al., 2014; Vidana et al., 2015). Por outro lado, o *Staphylococcus aureus* possui a parede celular predominantemente constituída por uma camada espessa de peptidoglicano. Essa camada protege a membrana citoplasmática, composta por fosfolipídios e proteínas. Em algumas espécies de *Staphylococcus*, a membrana pode estar rodeada por uma camada externa de proteínas organizadas em uma estrutura paracristalina. Além disso, a parede celular do *S. aureus* contém ácidos teicóicos, com terminações que permitem sua ligação ao peptidoglicano ou à membrana citoplasmática (Maranni, 2023).

Outra bactéria Gram-positiva seria o *Bacillus subtilis*, onde possui em sua membrana uma variedade de compostos lipídicos, incluindo diacilglicerol, glicolipídeos, lisilfosfatidilglicerol e entre outros (Silva et al., 2021). Os principais constituintes de sua parede celular incluem ácido lipoteicóico, peptidoglicano e polímeros aniônicos ricos em fosfato. Além disso, o *B. subtilis* produz poli-N-acetilglucosamina como um componente essencial na formação da película durante a matriz do biofilme (Roux et al., 2015).

Diante disso, a emergência de bactérias resistentes e multirresistentes representa uma ameaça significativa à saúde pública, uma vez que essas bactérias apresentam diversos padrões de resistência que dificultam a escolha de tratamentos eficazes. O aumento contínuo de patógenos resistentes aos antimicrobianos, aos quais os pacientes são expostos durante sua permanência em instituições de saúde, tem causado complicações na gestão das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (Esposito e De Simone, 2017).

A resistência mencionada refere-se a microrganismos que podem se multiplicar mesmo na presença de concentrações mais altas de antimicrobianos

do que as recomendadas para as doses terapêuticas. Nos últimos anos, tem havido um aumento preocupante de infecções causadas por cepas bacterianas resistentes aos antimicrobianos, especialmente em ambientes hospitalares. Esse problema de resistência bacteriana é considerado uma questão de saúde pública e tem chamado a atenção das autoridades da área em todo o mundo (Costa et al., 2017; Freitas et al., 2012).

Os antimicrobianos possuem certa resistência diante de um fenômeno genético em que os microrganismos possuem genes que codificam diferentes mecanismos bioquímicos para evitar a ação das drogas. Essa resistência pode ser natural, quando os genes de resistência fazem parte do código genético do microrganismo e são transmitidos para as células descendentes, ou adquirida, quando os genes de resistência são incorporados ao código genético por meio de transferência de material genético entre diferentes gêneros ou espécies bacterianas. Existem diferentes formas de transferência de genes de resistência, como transdução, transformação e conjugação, que envolvem plasmídios e transposons contendo genes de resistência. Além disso, mutações no DNA durante o processo de reprodução dos microrganismos podem levar ao desenvolvimento de resistência (Munita et al., 2016; Tavares, 2009).

Quando expostas a antimicrobianos, muitas bactérias têm a capacidade de ativar um estado chamado de “competência”, que aumenta sua capacidade de adquirir genes de resistência exógenos. A forma como esse estado de competência é desenvolvida parece depender do tipo específico de antimicrobiano utilizado. Esse mecanismo de competência permite que as bactérias absorvam material genético externo, como plasmídios ou fragmentos de DNA, que contêm genes de resistência. Assim, as bactérias podem adquirir novos genes que as tornam resistentes aos antimicrobianos, aumentando a sua sobrevivência e perpetuação (Slager et al., 2014).

Atualmente, as infecções mais graves que representam uma ameaça à vida são causadas por um grupo de bactérias resistentes aos antimicrobianos conhecido como “grupo ESKAPE”. Esse termo foi cunhado pela Sociedade Americana de Doenças Infecciosas e engloba as seguintes bactérias: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter spp.* (Esposito e Simone, 2017; Giono-Cerezo et al., 2020). A resistência dessas

bactérias aos antimicrobianos é um desafio significativo, pois dificulta o tratamento eficaz dessas infecções e aumenta o risco de complicações para os pacientes. Para enfrentar essa situação, é crucial adotar estratégias de prevenção e controle de infecções, a fim de combater a disseminação dessas bactérias resistentes e garantir a segurança dos pacientes (Giono-Cerezo et al., 2020).

Entre os cocos Gram-positivos resistentes aos antimicrobianos, o *Staphylococcus aureus* Meticilino-resistente (MRSA) é um patógeno de grande importância no ambiente hospitalar, estando associado a infecções graves como bacteremia e infecções de feridas cirúrgicas (Giono-Cerezo et al., 2020). Esses cocos Gram-positivos podem desenvolver resistência aos beta-lactâmicos devido a alterações nas proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs), que são o alvo de ação desses antibióticos. Essa resistência pode ocorrer por diferentes mecanismos, como diminuição da afinidade das PBPs, produção aumentada de uma PBP menos importante, produção de uma PBP adicional com baixa afinidade de ligação ou alteração na composição da PBP (Wilson, 2014).

Essas alterações são os principais mecanismos de resistência dos *estafilococos* à meticilina, oxacilina, e dos *pneumococos* às penicilinas. Nos *estafilococos*, a resistência está associada à presença de genes *Mec*, principalmente o gene *mecA*, codificando a proteína denominada PBP 2a da parede bacteriana, sendo transportado pelo elemento genético *Staphylococcal Cassette Chromosome* (Munita; Arias, 2016; Rosa et al., 2009).

Os bacilos Gram-negativos podem ser classificados em dois grupos: aqueles que fermentam glicose e aqueles que não fermentam. Os bacilos Gram-negativos fermentadores de glicose estão associados a várias infecções adquiridas em unidades de terapia intensiva (UTI), especialmente infecções respiratórias e urinárias. Essas bactérias têm mostrado taxas elevadas de resistência a quinolonas, beta-lactâmicos e aminoglicosídeos, geralmente devido à produção de enzimas chamadas beta-lactamases (Porto, 2021).

Os principais membros desse grupo abrangem *Enterobacter spp.*, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Serratia spp.*, *Citrobacter spp.* e *Proteus spp.* É relevante ressaltar a preocupação com os agentes que produzem beta-lactamases de amplo espectro (ESBL) e aqueles que produzem carbapenemases, pois eles possuem resistência a uma ampla variedade de

antibióticos. Os bacilos Gram-negativos não-fermentadores de glicose são comumente encontrados em infecções do trato respiratório. Os principais representantes desse grupo são as cepas de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter spp.* Embora menos frequentes em infecções em unidades de terapia intensiva (UTI), as bactérias *Stenotrophomonas maltophilia* e *Burkholderia cepacia* desempenham um papel importante em infecções nas unidades de hemodiálise e em pacientes imunodeprimidos. Essas bactérias não-fermentadoras de glicose possuem características que as tornam resistentes a muitos antibióticos, o que pode dificultar o tratamento eficaz das infecções causadas por elas (ANVISA, 2021).

Os Bacilos Gram-negativos (BGN) apresentam diversos mecanismos de resistência aos antibióticos. Um dos principais mecanismos é a produção de enzimas, como as beta-lactamases, que têm a capacidade de inativar penicilinas e cefalosporinas de amplo espectro. As metalo-beta-lactamases, em particular, são produzidas por bactérias como *Pseudomonas spp.* e *Acinetobacter spp.*, conferindo resistência aos carbapenêmicos, que são antibióticos amplamente utilizados no tratamento de infecções causadas por BGN multirresistentes. Além disso, outros mecanismos de resistência incluem a perda de porinas na parede bacteriana, o efluxo de antibióticos a partir do ambiente intracelular e a modificação do sítio de ligação dos antibióticos. Esses mecanismos contribuem para a dificuldade no tratamento das infecções causadas por BGN resistentes, tornando necessário o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas (ANVISA, 2021).

As bactérias multirresistentes (MDR) são frequentemente associadas ao desenvolvimento de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde, especialmente em pacientes críticos. Um estudo realizado em um hospital terciário na China envolvendo 15.588 pacientes revelou que 7.579 (48,6%) deles tiveram uma infecção hospitalar, sendo que microrganismos MDR foram encontrados em 3.223/7.579 (42,5%) dos isolados. As bactérias MDR mais comumente identificadas foram *Escherichia coli* ESBL, presente em 37,7% (1.216/3.223) dos casos, seguida por *Pseudomonas aeruginosa* MDR com 19,5% (627/3.223) e *Acinetobacter baumannii* MDR com 18,2% (588/3.223). Os patógenos MDR foram mais frequentes em homens, representando 64,4% (2.074/3.223) dos casos (WANG et al., 2018).

### 3.3 Métodos convencionais de diagnóstico

No contexto das variadas causas associadas às infecções da corrente sanguínea, tais como o emprego de dispositivos invasivos, a translocação bacteriana e a administração de soluções contaminadas, torna-se imperativo compreender esses elementos para garantir uma prevenção e tratamento eficazes dessas infecções (Chaves, 2017). Nesse sentido, a implementação de métodos diagnósticos assume relevância crucial para a identificação precisa desses patógenos.

Desta forma, a coloração de Gram é um método usado para identificar a causa precisa de uma infecção de forma mais eficaz. Quando se trata de leveduras, elas são classificadas como Gram-positivas. Como exemplo, nesse processo de diagnóstico, uma amostra de muco cervical ou raspado da cérvix é coletada, colocada em uma lâmina de microscópio e deixada para secar antes da aplicação da coloração de Gram. Essa técnica permite a visualização da microbiota vaginal, células presentes, morfologia bacteriana, presença de leucócitos, inflamação e a identificação de patógenos, como fungos. Com isso, os profissionais de saúde podem realizar uma avaliação adequada, possibilitando a exclusão de vaginites causadas por bactérias e protozoários (Sanches et al., 2020; Soares et al., 2018).

A cultura é um método de diagnóstico amplamente utilizado, como demonstrado na tabela 2, especialmente quando um exame microscópico a fresco mostra um resultado negativo. Para isso, as amostras são cultivadas em meio ágar Sabouraud ou Nickerson. Quando disponível, o ágar cromogênico é utilizado para diferenciar as diferentes espécies de *Candida* e é a opção preferida para o estudo da candidíase vulvovaginal (Sobel, 2007).

**Tabela 2** - Vantagens e desvantagens dos métodos convencionais para a identificação das espécies de *Cândida spp* e bactérias gram positivas e negativas.

| <b>Método convencional</b>                     | <b>Vantagem</b>   | <b>Desvantagem</b>   | <b>Microrganismos</b>   |
|--|---|--|---|
| Cultura microbiológica                         | Ampla aplicação;<br>Identificação de microrganismos e etc.                | Tempo para obtenção do resultado;<br>Limitações ao nível de gênero e espécies na identificação dos microrganismos e etc. | Espécies de <i>Candida spp</i> ;<br>Bactérias gram negativas e positivas. |
| Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)           | Sensibilidade;<br>Rápido diagnóstico e etc.                               | Alto custo;<br>Especialistas para a elaboração e etc.  | Bactérias gram positivas e negativas;<br>Espécies de <i>Candida spp</i> . |
| Coloração de gram                              | Facilidade para interpretação;<br>Auxilia na seleção do tratamento e etc. | Não indica patogenicidade;<br>Limitações na identificação específica e etc.  | Bactérias gram positivas e negativas.                                     |
| Ensaio Imunoabsorvente Ligado a Enzima (ELISA) | Sensibilidade;<br>Rapidez para obtenção do diagnóstico e etc.             | Utilização de marcadores;<br>Reação cruzada diante dos microrganismos etc.   | Espécies de <i>Candida spp</i> ;<br>bactérias gram negativas e positivas. |

Fonte: Próprio autor.

O ágar Sabouraud é um meio de cultura amplamente utilizado na microbiologia para o cultivo de fungos e bactérias. Sua eficiência e custo acessível o tornam uma escolha popular nesse contexto. Esse meio permite o crescimento e isolamento de cepas, sendo uma ferramenta importante no diagnóstico e estudo de infecções por patógenos. Uma variante comumente empregada é o ágar Sabouraud modificado, que contém agentes antibacterianos e cicloheximida. Esses componentes têm o propósito de inibir o crescimento de bactérias e fungos indesejados, auxiliando no isolamento e identificação mais precisa. Além disso, essa formulação modificada também demonstra eficácia na inibição do crescimento de certas espécies de *Candida* não-albicans, como a *C. glabrata*, contribuindo para um diagnóstico mais preciso dessas infecções (Duo Filho; Siqueira; Colombo, 2020; Spalanzani; Santosweiss, 2020).

O ágar cromogênico é um meio de cultura que possibilita a diferenciação de várias espécies de *Candida*. Por meio da metabolização do substrato  $\beta$ -glicosaminidase pelas leveduras, as colônias adquirem formas e cores características, o que facilita a identificação das diferentes espécies. Esse método é comumente utilizado na identificação de *Candida spp.* No entanto, é importante destacar que o ágar cromogênico pode levar de dois a quatro dias para fornecer resultados, e alterações nos padrões de cores das colônias podem resultar em um diagnóstico menos preciso e atrasar a implementação de medidas terapêuticas eficazes para o tratamento da infecção. É fundamental levar em consideração esses aspectos ao interpretar os resultados obtidos por meio desse método (Valente; Lopes; Reis, 2021).

Nessa perspectiva, as técnicas moleculares se apresentam como possibilidade de solução para essa questão (Siqueira; Almeida, 2018). Sendo uma técnica molecular específica e segura, nomeada de Nested-PCR, empregue para a identificação fúngica, que averiguar a zona de interesse, nomeada de ITS (Internal Transcribed Spacer) do DNA ribossômico, consistindo na preservação dos fungos pela possibilidade de distinção das variadas espécies. Essa abordagem demonstra também eficácia, por sua capacidade de identificar com precisão a espécie em questão, mesmo quando disponível apenas uma pequena quantidade de DNA fúngico para análise (Alves et al., 2010; Siqueira; Almeida, 2018). No entanto, os métodos moleculares não têm a capacidade de distinguir

entre organismos viáveis e não-viáveis, o que pode levar a uma subestimação do risco de infecção (Girones et al., 2010).

As técnicas convencionais de análise possuem suas limitações, especialmente em termos de sensibilidade e seletividade. Por isso as vantagens dos biossensores em relação a essas técnicas vão além desses aspectos. Uma das principais vantagens dos biossensores é a possibilidade de pré-elaboração, ou seja, eles podem ser preparados antecipadamente e prontos para uso quando necessário na análise da amostra. Isso proporciona rapidez nas análises e maior agilidade na obtenção do diagnóstico. Além disso, essa pré-elaboração contribui para a redução do custo operacional, resultando em uma economia significativa no processo de análise (Brahim, 2002).

Tendo em vista que existem métodos utilizados no diagnóstico de leveduras, como um padrão-ouro, sendo esses métodos convencionais que prolongam o tempo de resposta (2 a 4 dias) e são privados de sensibilidade para identificação do microrganismo. Assim como os testes sorológicos, nomeados de ensaios imunossorventes ligados as enzimas (ELISA), mesmo contendo uma maior sensibilidade para a identificação de *Candida*, este ensaio exige o uso de marcadores e pode exibir reação cruzada com microrganismos patogênicos e comensais, resultando em um falso-positivo (Villamizar et al., 2009). Outros teste que apresentam um longo tempo de resposta, porém são confiáveis e sensíveis, são os teste de reação em cadeia da polimerase (PCR) e outras análises moleculares, contudo tem um alto custo em reagentes e equipamentos, além de necessitarem de especialistas (Lauri e Mariani, 2009).

Para o correto diagnóstico acerca do tratamento de infecções fúngicas é necessário que seja direcionado a respectiva espécie. Entretanto, se executado de maneira incorreta, pode ocorrer a propagação e distinção das cepas mais resistentes a certos medicamentos e conseqüentemente agravar a infecção (Poissy et al., 2020). Dito isso, torna-se relevante a importância de um diagnóstico adequado e ágil para a introdução de um tratamento prévio, contribuindo para a melhoria do estado clínico do paciente (Siqueira; Almeida, 2018; Poissy et al., 2020).

### 3.4 Biossensores

O biossensor eletroquímico desenvolvido por Leland Clark e Ann Lyons em 1962 para medir o oxigênio dissolvido em líquidos, utiliza um eletrodo de platina com uma membrana permeável ao oxigênio, permitindo a medição da concentração de oxigênio através de uma corrente elétrica. Esse sensor tornou-se amplamente utilizado em aplicações clínicas, pesquisas científicas e outras áreas que requerem medição precisa de oxigênio. Suas vantagens incluem resposta rápida, baixo custo e não invasivo, mas também tem limitações, como a interferência de outras substâncias e desgaste do eletrodo ao longo do tempo (Liu et al., 2019; Shi et al., 2017; Wong et al., 2020; Clark e Lyons, 1962).

No setor de saúde, observa-se um notável crescimento econômico, destacando-se, em particular, os avanços significativos no campo dos diagnósticos biomédicos. Esse crescimento é impulsionado, em grande parte, pela concepção e utilização de biossensores na pesquisa clínica, incluindo detecção de colesterol, glicose sanguínea, gases sanguíneos, testes de gravidez, análises toxicológicas e doenças infecciosas (Research and Markets, 2021). A nanociência é um campo multidisciplinar que envolve biologia molecular, bioquímica, engenharia e física. Ela desempenha um papel crucial na criação de insumos e ferramentas biotecnológicas avançadas. Um exemplo notável dessas inovações são os nanodispositivos biotecnológicos (Texeira, 2021).

Esses dispositivos em escala nanométrica possuem diversas aplicações práticas em várias áreas, como na segurança alimentar, eles podem ser usados para detectar contaminantes e melhorar a qualidade dos alimentos. Na área de diagnósticos clínicos, podem auxiliar na detecção precoce de doenças e na monitorização da resposta ao tratamento. Além disso, esses nanodispositivos também são valiosos no monitoramento ambiental, permitindo a detecção e quantificação de poluentes. No setor industrial, eles desempenham um papel importante no controle de qualidade de produtos, garantindo a conformidade e a segurança dos mesmos (Arduini et al., 2016).

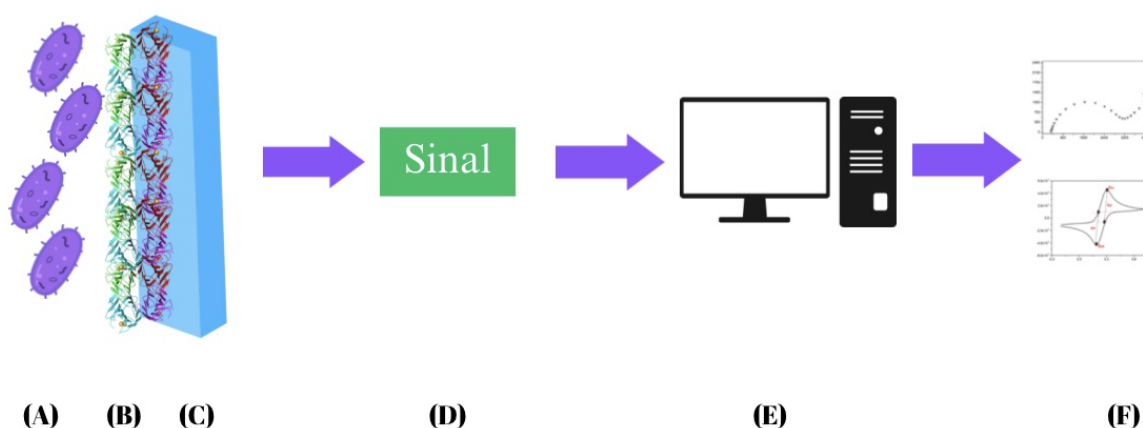
Os biossensores identificam e medem alterações bioquímicas em uma superfície operacional, convertendo essas mudanças em sinais mensuráveis, precisos e em tempo real (Perumal e Hashim, 2014; Neethirajan et al., 2017).

Essas tecnologias têm sido objeto de extensas pesquisas, focadas em aprimorar sua especificidade, sensibilidade e técnica de multiplexação. Como resultado desses esforços, os biossensores evoluíram para dispositivos autônomos com a capacidade de identificar componentes biológicos específicos, proporcionando análises tanto qualitativas quanto quantitativas (Perumal e Hashim, 2014).

O conceito de biossensores pode ser descrito como um aparelho eletrônico que transmite características únicas sobre informações analíticas em relação a alvos moleculares. Os elementos operacionais básicos compreendem um biossensor são: o componente biológico, um transdutor, sistema de amplificação e processamento de sinal. O componente receptor responsável por identificar alvos moleculares, corresponde uma molécula biológica, sendo essas interações intermoleculares específicas ou reações catalíticas (Morales e Halpern, 2018). Nesse sentido, o transdutor desempenha a função de converter a resposta bioquímica originada pelo processo de biorreconhecimento em um sinal mensurável, que por sua vez, reflete de forma direta a concentração do analito detectado. Em síntese, o sistema de amplificação e o processamento de sinal fornece o dado analítico, sendo este representado por gráficos através de software em monitores de computadores, como apresentado na figura 7 (Bazin et al., 2017; Sireesha et al., 2018).

Como mencionado anteriormente, um aspecto fundamental para desenvolvimento dos biossensores é que o componente de reconhecimento biológico seja sensível e estável (Wang et al., 2013). Além disso, quando os biossensores são comparados aos métodos analíticos convencionais apresentam vantagens, como resposta rápida, alta seletividade, fácil manuseio e em conformidade ao modelo desenvolvido a possibilidade de reutilização (Gagliardi et al., 2007). Com tal característica, alguns aspectos precisam levados em consideração para a construção de um biossensor, como a construção da curva de calibração e curva padrão, caracterização dos componentes biológicos e sua uniformidade e a concepção da superfície (Piermarini, et. al., 2007).

**Figura 7** - Representação esquemática de um biossensor. O processo de detecção do analito (A) ocorre através da interação com o componente biológico (B) e está associado ao transdutor (C), que é responsável por converter essa interação bioquímica em um sinal mensurável (D). Esse sinal é então processado por um software computacional (E), e os dados resultantes são apresentados na forma de gráficos (F).



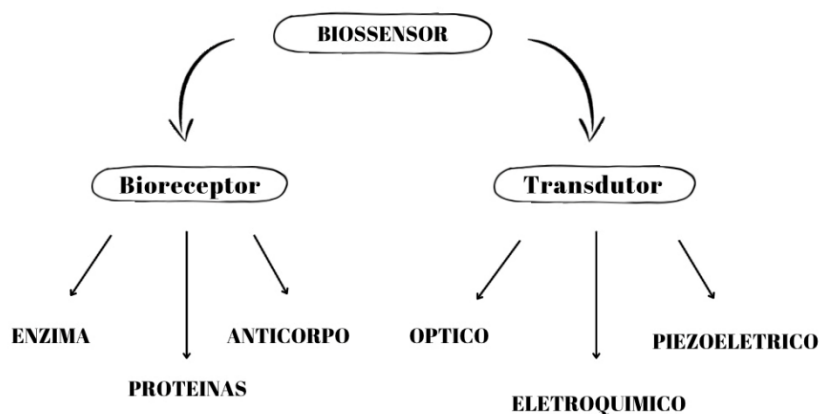
Fonte: Canva por próprio autor.

Os biossensores podem ser classificados de acordo com o tipo de bioreceptor, ou seja da biomolécula imobilizada na superfície (proteína, enzimas, anticorpos, lectinas, oligonucleotídeo, entre outros). Em adição, os biossensores também podem ser classificados de acordo com o transdutor, como descrito na fig. 8. Sensores potenciométricos têm a capacidade de detectar mudanças na distribuição de cargas elétricas. Com isso, os biossensores ópticos podem ser do tipo calorimétrico, identificando alterações na absorção de luz, ou fotométrico, detectando mudanças na intensidade de fótons. Já os sensores piezoelétricos são capazes de detectar variações de massa e vibração no cristal piezoelétrico (McNamara & Tofail, 2017; (Hosu et.al., 2018).

Os biossensores eletroquímicos podem ser classificados em três tipos: potenciométricos, amperométricos e condutométricos. Os transdutores potenciométricos são utilizados para medir a diferença de potencial (DDP) entre um eletrodo indicador e um eletrodo de referência, ou entre dois eletrodos de

referência separados por uma membrana permeável, onde não há presença de corrente elétrica (Dai et al., 2016). Os transdutores amperométricos são responsáveis por medir a corrente elétrica gerada durante o processo oxidativo ou redutivo de uma espécie eletroativa, geralmente no momento em que ocorre a transferência de elétrons entre o substrato e o transdutor (Lu et al., 2018).

**Figura 8** - Ilustração representativa dos diferentes tipos de biossensores.



Fonte: Próprio autor.

Entretanto, os transdutores amperométricos operam por meio do processo difusivo, o que resulta em algumas desvantagens. Eles podem apresentar uma saturação das enzimas, o que limita a quantidade de analito que pode ser detectada. Além disso, o aumento dos potenciais usados no processo pode levar à oxidação de constituintes, afetando as correntes medidas, as quais também são influenciadas pela velocidade de difusão do substrato até o eletrodo. No entanto, estudos estão sendo conduzidos para superar essas limitações dos processos difusivos, visando manter a concentração do analito em níveis mais baixos de saturação das enzimas (Lu et al., 2018).

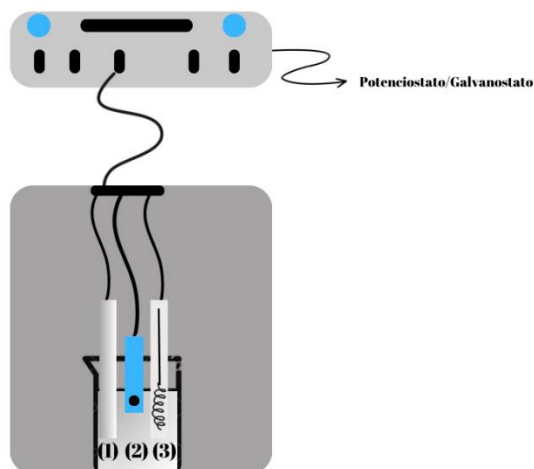
Os transdutores condutimétricos monitoram a condutância entre eletrodos metálicos, respondendo a mudanças causadas por componentes biológicos. Embora pouco utilizados, podem detectar variações catalisadas por enzimas sem exigir eletrodos de referência. Contudo, sua estabilidade é sensível à temperatura, o que limita sua aplicação prática e torna-se importante a não diluição em amostras analisadas (Xu, 2016).

Em sistemas de sensores, é comum encontrarmos células eletroquímicas compostas por dois, três ou quatro eletrodos. Os sistemas mais utilizados são aqueles que possuem dois ou três eletrodos. Nos sistemas de dois eletrodos, temos o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência. Ao aplicar um potencial ao eletrodo de trabalho, ele se polariza. No entanto, essa técnica apresenta algumas desvantagens, por exemplo, se a resistência aumentar, também ocorrerá um aumento na corrente que passa pelos eletrodos, o que pode distorcer os dados obtidos, essa distorção pode tornar o método inviável (Pacheco et al., 2013).

A célula eletroquímica de três eletrodos é amplamente utilizada em investigações eletroquímicas e na elaboração de biossensores. Essa configuração envolve o uso de três eletrodos: o contraeletrodo (CE) (1), eletrodo de trabalho (ET) (2) e o eletrodo de referência (ER) (3), como observado na figura 9. A corrente flui entre o contraeletrodo e o eletrodo de trabalho, enquanto a diferença de potencial é medida entre o eletrodo de referência e o eletrodo de trabalho. Essa abordagem permite controlar o potencial na interface do eletrodo de trabalho em relação ao eletrodo de referência, que mantém um potencial constante (AUTOLAB, 2011).

Entre os inúmeros tipos de sensores desenvolvidos, evidenciam-se os eletroquímicos, que contribuem para informar de forma qualitativa e quantitativa um determinado analito por meio de um sinal elétrico. Esses aparatos usam a corrente elétrica como parâmetro para atrair uma técnica de oxidação ou redução no analito, sendo essa relacionada à concentração da espécie-alvo (Huang et al., 2021; Porfírio; Giarola; Pereira, 2016).

**Figura 9** - Esquema de uma célula eletroquímica convencional de três eletrodos utilizados para avaliação da superfície, sendo o contraeletrodo (CE) (1), eletrodo de trabalho (ET) (2) e o eletrodo de referência (ER) (3).



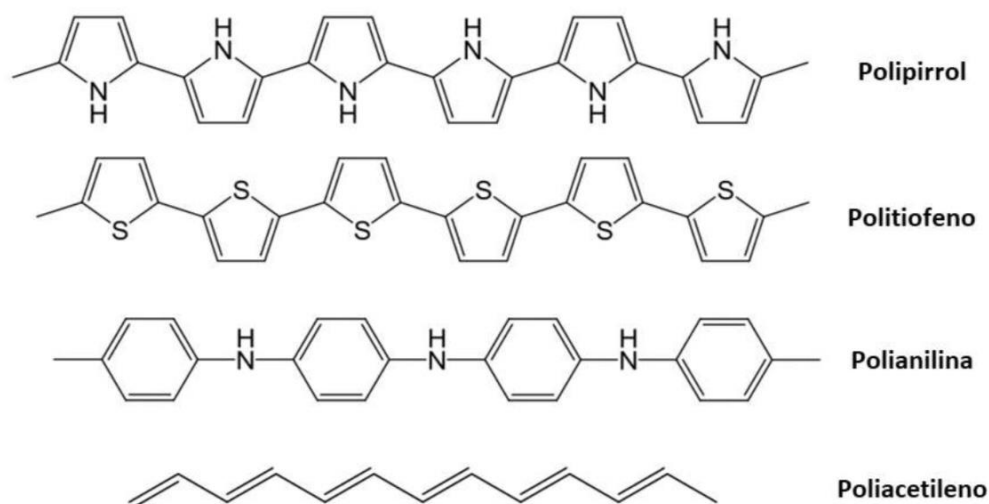
Fonte: Próprio autor.

### 3.4.1 Polímeros Condutores

Os polímeros condutores têm atraído a atenção devido as amplas técnicas de modificação superficial de eletrodos, o que impulsiona a criação de dispositivos ultrasensíveis, caracterizados por alta seletividade, baixos limites de detecção e propriedades aprimoradas (Teles e Fonseca, 2008; Ates, 2013; Shoaie et al. 2019; Costa et al., 2012). Materiais como PANI, PPy, poliacetileno, politiofeno, poli-(p-fenileno) e poli-(fenileno vinileno) são reconhecidos como elementos funcionais para a nanoestruturação de plataformas sensoras, abrindo novas perspectivas tecnológicas no desenvolvimento de biossensores (Jain et al., 2017).

Conforme ilustrado na Fig. 10, de maneira geral, os polímeros condutores possuem cadeias que incluem anéis aromáticos ou cadeias lineares com duplas ligações C=C conjugadas. Essa ligação dupla é formada por uma ligação sigma ( $\sigma$ ), que é forte, e uma ligação pi ( $\pi$ ), que é menos localizada e mais fraca (Custódio, 2023).

**Figura 10** – Estruturas moleculares dos polímeros condutores.



Fonte: Adaptado de Avelino, 2021.

Os polímeros condutores, quando não dopados ou em suas formas neutras, podem agir como materiais isolantes ou semicondutores. Contudo, mediante processos de dopagem, eles se convertem em portadores de carga deslocalizados, permitindo o transporte elétrico e elevando consideravelmente a condutividade em diferentes ordens de magnitude. É importante ressaltar que a dopagem refere-se à ampliação da capacidade de condução de carga. Isso ocorre ao adicionar elétrons à banda de condução, utilizando agentes redutores ou ao remover elétrons da banda de valência, por meio de agentes oxidantes (Avelino, 2021).

O polímero PPy é composto por anéis heterocíclicos insaturados de quatro carbonos ( $C_4H_5N$ ), conhecidos como pirrol (Fig. 10). Essas macromoléculas são comumente produzidas por métodos químicos e eletroquímicos. Contudo, devido ao crescente interesse em biossensores miniaturizados, a rota de síntese eletroquímica se destaca por suas características singulares (Gvozdenović et al., 2014).

Durante o processo de eletropolimerização do PPy, em que o monômero pirrol está disperso em uma solução eletrolítica, o referido monômero é sujeito a variações de potencial ou corrente dentro de uma célula eletroquímica. A

resultante polarização anódica e catódica conduz à oxidação da unidade monomérica, originando assim um radical cátion primário (Shoaie et al., 2019).

O produto inicial reage com um radical cátion, formando um dímero dicátion. Esse dímero é estabilizado e, ao perder dois prótons, reconstitui o sistema aromático. A substância intermediária resultante pode se combinar com outro radical cátion, formando um trímero ou com outro dímero. A reação de eletropolimerização continua acoplando cátions de monômeros e cátions de oligômeros até a formação do filme polimérico de PPy. As propriedades de materiais eletrossintetizados são afetadas por condições de síntese, como concentração do monômero, natureza do meio eletrolítico e temperatura (Avelino, 2021).

Em 2023, Silva demonstrou uma abordagem inovadora para o desenvolvimento de uma plataforma bioeletroquímica baseada no nanocompósito de PPy-AuNPs-GO para detecção bacteriana. Utilizando o peptídeo Lt-MAP4 e empregando técnicas eletroquímicas como voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica, para avaliar a eficácia do sistema. A plataforma foi capaz de identificar e diferenciar amostras bacterianas de interesse médico em concentrações de  $10^1$  a  $10^6$  UFC por mL, representando um avanço significativo na área de diagnóstico microbiológico (Silva, 2023). Outro trabalho realizado Santos et al., em 2017, focalizou a criação de um biossensor de DNA para a detecção eletroquímica do oncogene quimérico BCR/ABL, utilizando polipirrol, NpsZnO e quitosana. Demonstrando a capacidade de identificar o oncogene quimérico BCR/ABL mesmo em concentrações mínimas, com um limite de detecção de 138 aM (Santos et al., 2017).

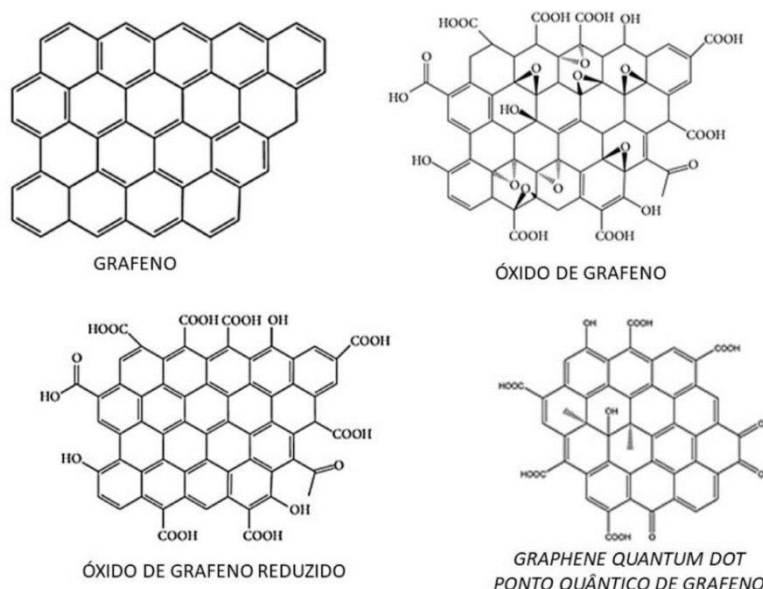
#### 3.4.2 Pontos Quânticos

Dentro da categoria dos nanomateriais, os pontos quânticos destacam-se por suas notáveis propriedades ópticas e eletrônicas (Ngo e Mora-Seró, 2019). Esses semicondutores nanocristalinos, com dimensões físicas entre 1 e 10 nm, exibem um confinamento quântico, resultando em absorção e emissão de luz nas regiões visível, ultravioleta e infravermelho próximo, o que amplia suas aplicações em diversos campos tecnológicos (Stroyuk et al., 2018; Hong et al., 2019; Jain et al., 2019).

Em suma, categoria de materiais do grafeno inclui diversos componentes, como demonstrado na Fig. 11, como o óxido de grafeno, o GQD e o óxido de grafeno reduzido, onde contêm grupos orgânicos, como ácido carboxílico, epóxi e hidroxila, que ampliam a capacidade de funcionalização e sua aplicação em biossensores e transportadores de fármacos (Gurunathan et al., 2019; Fu et al., 2019; Singh et al., 2018; Tatar et al., 2016; Sheng et al., 2013).

O grafeno consiste em uma camada bidimensional de átomos de carbono. Suas propriedades incluem fotoluminescência, alta condutividade elétrica, flexibilidade, resistência mecânica e transparência (Félix, 2020). O GQD possui uma estrutura química semelhante ao óxido de grafeno, composto por átomos de oxigênio, hidrogênio e carbono, sendo seus grupos -COOH cruciais para determinar a solubilidade e a capacidade de ligação com outras substâncias. Essas nanopartículas esféricas, apresentando uma ou poucas camadas, possuem um tamanho aproximado de 100 nm (Zhao et al., 2020; Tian et al., 2018).

**Figura 11** - Representação química do grafeno e seus derivados óxido de grafeno, óxido de grafeno reduzido e o ponto quântico de grafeno.



Fonte: Adaptação de Félix, 2020.

Essa característica representa uma vantagem na produção de partículas com baixo custo e reprodutibilidade em larga escala. Além disso, a utilização de

metodologias que não geram compostos tóxicos é possível (Iravani e Varma, 2020). Dessa forma, a funcionalização do grafeno e de seus derivados possibilita a incorporação de grupos químicos que facilitam a interação com várias substâncias (Kumar et al., 2020; Price et al., 2019). A interação por forças de Van der Waals, empilhamento via  $\pi$ - $\pi$  e ligações covalentes são algumas das formas de ligações estabelecidas no grafeno. Através da funcionalização, é possível introduzir grupos e estruturas funcionais, conferindo a esse elemento novas características (Douda et al., 2019; De Melo-Diogo et al., 2018; Kumar; Rani, 2015).

Os Quantum Dots de Grafeno (GQDs) também são empregados como ferramenta em biossensores para a detecção do câncer, devido às suas propriedades químicas e capacidade de detectar biomoléculas (Mansuriya e Altintas, 2020; Kumar et al., 2020; Ganganboina e Doong, 2019; Vargis et al., 2018; Liu et al., 2018). Além disso, trabalhos como o de Oliveira et al., 2023, destacam avanços significativos na pesquisa, evidenciando a importância de genossensores baseados em PPy e GQDs para a triagem do oncogene de fusão PML-RAR $\alpha$ , com notável eficiência na detecção sem marcação em 15 minutos e limites de detecção sensíveis para sequências específicas como M7 e APLB (Oliveira et al., 2023). Cincotto e colaboradores em 2019, desenvolveram um dispositivo eletroquímico microfluídico em papel que possui duas áreas distintas: uma delas é modificada com pontos quânticos de grafeno para a detecção do ácido úrico, enquanto a outra funciona como um biossensor também modificado com pontos quânticos de grafeno. Neste caso, a enzima utilizada foi a creatininase, e o cloreto de hexaminrutênio foi empregado como mediador de elétrons para a determinação da creatinina. Este dispositivo permitiu a detecção simultânea de ácido úrico e creatinina, alcançando limites de detecção de 8,4 nmol L<sup>-1</sup> e 3,7 nmol L<sup>-1</sup>, respectivamente (Cincotto et al., 2019).

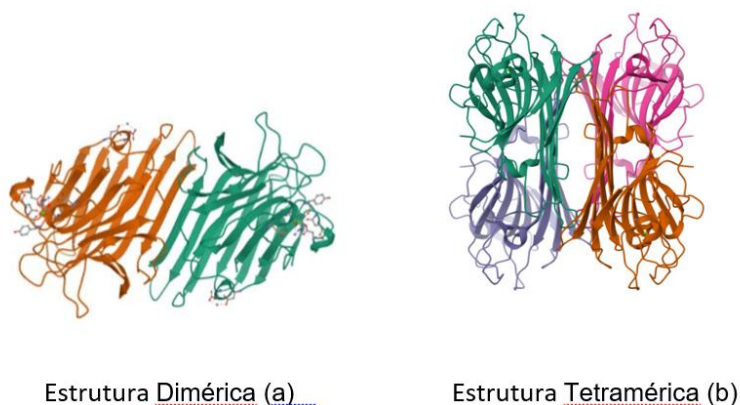
### 3.4.3 Biossensores eletroquímicos baseados em lectinas

No campo dos biossensores, tem havido um interesse crescente nas interações entre proteínas e carboidratos. Um exemplo notável é o uso de lectinas, que são proteínas especializadas no reconhecimento de certos carboidratos específicos, que podem identificar carboidratos presentes na superfície de células cancerígenas ou na estrutura de microrganismos patogênicos (Gautam et al., 2020).

A lectina de *Canavalia ensiformis*, conhecida como Con A, possui uma estrutura terciária predominantemente composta por monômeros que possuem 237 aminoácidos, de peso molecular aproximado é 25 kDa, dispostos em duas grandes folhas  $\beta$  antiparalelas (Cavada et al., 2019; Correia, 2022).

Em relação à oligomerização, a Concanavalina A forma tetrameros, sendo demonstrado na Fig. 12, o que significa que consiste em quatro subunidades idênticas. Esses monômeros podem se interligar adjacente, formando uma folha  $\beta$  com 12 fitas, seis de cada monômero, que é comumente chamada de dímero "canônico". A ConA é dimérica em pH 5,0 e tetramérica em pH acima de 7,0. Esse processo de oligomerização é sensível ao pH, e a formação do oligômero ocorre através de interações não covalentes, como ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e eletrostáticas.

**Figura 12** - Estrutura dimérica (a) e tetramérica (b) da concanavalina A.



Fonte: Adaptação de Peptídeos em Protein Data Bank - PDB.

Portanto, essa característica tem um impacto significativo na capacidade da ConA de se ligar a carboidratos, o que, por sua vez, influencia suas atividades biológicas (Mandal et al., 1993; Correia, 2022).

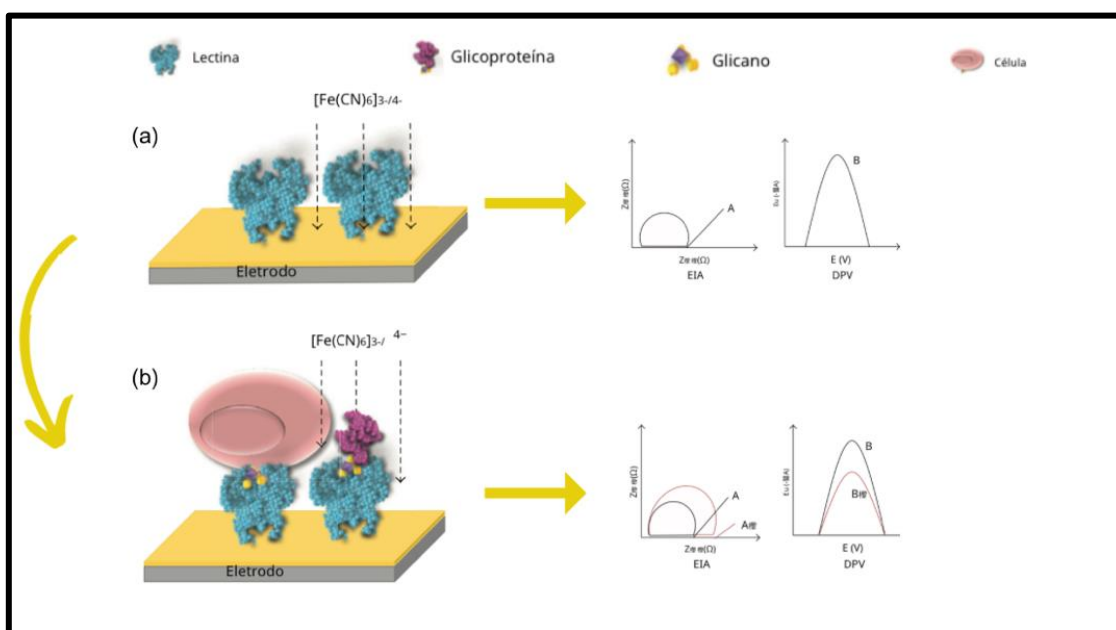
As lectinas são proteínas ou glicoproteínas que desempenham um papel significativo no sistema imunológico, pois possuem a capacidade única de se ligar de forma específica a açúcares e oligossacarídeos. Isso tem levado ao seu uso em biossensores, onde sua afinidade por carboidratos específicos possibilita a detecção precisa em células alvos e açúcares (Gautam et al., 2020). Um exemplo notável é a Concanavalina A, uma lectina que se destaca nesse contexto. A ConA possui quatro sítios de ligação que se encaixam perfeitamente com açúcares como a D-glicose e a D-manose e entre outros, encontradas na estrutura de leveduras e lipopolissacarídeos de bactérias. Devido a essa alta especificidade de ligação, a Concanavalina A é frequentemente utilizada para identificar e distinguir diversas espécies de microorganismos com relevância clínica (Wang e Anzai., 2015; Sá et al., 2020).

Desta forma, a partir da tentativa de Costa (2022), onde apresentou os resultados de um biossensor impedimétrico desenvolvido com uma monocamada de cisteína (Cys) sobre ouro contendo nanopartículas de CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> e a lectina concanavalina A, com o objetivo de detectar *Escherichia coli*. As nanopartículas de CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> foram previamente sintetizadas e funcionalizadas com 3-aminopropiltriétoxissilano (APTES) para fornecer extremidades com -NH<sub>2</sub> (CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>@NH<sub>2</sub>). Observou-se um efeito de bloqueio mais intenso em soluções contendo a bactéria *E. coli*, mostrando uma dependência com sua concentração, o que permitiu o uso do biossensor Au/Cys/NPs/ConA para detecção de *E. coli* em uma faixa linear de  $1,7 \times 10^1$  a  $8,3 \times 10^4$  UFC/mL, com um limite de detecção (LOD) de  $0,2 \times 10^{-3}$  UFC/mL após apenas 15 minutos de contato (Costa, 2022).

No contexto do sistema eletroquímico, a presença de células ou glicoproteínas na superfície do eletrodo influencia a resistência à transferência de carga e os sinais de corrente. Na figura 13, é possível observar que antes da ligação (a), são obtidos sinais de resistência à transferência de carga ou corrente na superfície modificada. Após a ligação (b), a presença de células ou glicoproteínas gera um maior bloqueio para a transferência de carga, resultando em um aumento na resistência à transferência de carga (representada pelo

semicírculo A) para a resposta na espectroscopia de impedância eletroquímica e uma redução na amplitude da corrente para a resposta voltametria de pulso diferencial (Coelho et al., 2017).

**Figura 13-** Superfície do eletrodo modificado por lectina se comporta antes (a) e depois (b) da ligação.



Fonte: Adaptado de Coelho et al., 2017.

Em outro estudo relevante, Nobrega em 2019, desenvolveu o biossensor Au/HS2BP/ConBr para detecção de carboidratos. O biossensor foi caracterizado utilizando técnicas de impedância eletroquímica e voltametria cíclica, com  $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$  como espécies de prova. Por meio de voltametria de varredura linear, determinou-se a quantidade de moléculas adsorvidas ( $\Gamma$ ) de HS2BP como  $3,03 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$ , indicando uma monocamada. Além disso, o valor de pKa de superfície da espécie HS2BP foi determinado como 6,08. A resistência à transferência de carga entre o eletrodo Au/HS2BP/ConBr e as espécies de prova, calculada pela técnica de impedância eletroquímica, mostrou uma relação linear com a concentração (de 25 a 125  $\text{nmol L}^{-1}$ ) de manose ou glicose no meio. O limite de detecção do biossensor foi calculado como 0,73 e 0,07  $\text{nmol}$

L-1 para glicose e manose, respectivamente, evidenciando sua sensibilidade para a detecção desses carboidratos em solução (Nobrega, 2019).

O estudo conduzido por Oliveira et al. (2011), foi elaborado um biossensor utilizando a lectina Cramoll e nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> em um eletrodo de ouro. O objetivo principal era analisar as interações entre essa lectina e as glicoproteínas presentes nos soros de pacientes infectados com os sorotipos 1, 2 e 3 do vírus da dengue. Através de medições eletroquímicas, observou-se uma heterogeneidade nos sinais eletroquímicos resultantes das interações da Cramoll com as glicoproteínas dos diferentes sorotipos, o que pode ter potencial aplicação no diagnóstico da dengue. Além disso, o mesmo grupo de pesquisa desenvolveu um outro biossensor eletroquímico baseado em nanopartículas de ouro e Cramoll. Esse biossensor foi projetado especificamente para o reconhecimento do lipopolissacarídeo de diferentes bactérias gram-negativas (Oliveira et al., 2011).

Diversos estudos têm mostrado que a lectina possui a capacidade de detectar e diferenciar diferentes espécies de bactérias e fungos. Um exemplo disso é o trabalho realizado por Sá et al. em 2020, onde foi desenvolvida uma plataforma biossensora baseada em nanopartículas de ouro (AuNPs), utilizando as lectinas ConA e WGA (wheat germ agglutinin). Essa plataforma foi capaz de identificar e diferenciar quatro espécies de *Candida spp.*, com um limite de detecção de 10<sup>2</sup> CFU.mL<sup>-1</sup>. A lectina ConA apresenta uma alta afinidade por certos monossacarídeos, como a Glc e a Man, que são encontrados na parede celular das espécies de *Candida spp.* Essa afinidade permite que a lectina interaja e "capture" os microrganismos no biossensor, tornando mais fácil a identificação e diferenciação das espécies (Masuoka, 2004).

Na detecção de bactérias, as lectinas, como a ConA, interagem principalmente com resíduos de Glc (glicose) e Man (manose) presentes no LPS de espécies Gram-negativas, bem como no peptidoglicano e LTA de espécies Gram-positivas (Ml et al., 2021). No estudo realizado por Yaghoubi et al., 2020 onde desenvolveram um biossensor para identificação de *E. coli* e *S. aureus* utilizando ConA e WGA (aglutinina de germen de trigo) por meio de espectroscopia de transformada de Fourier de interferência reflectométrica (RIFTS), alcançando um limite de detecção de 10<sup>3</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> (Yaghoubi et al., 2020).

Os biossensores que utilizam lectinas estão sendo utilizados como componentes de detecção molecular em dispositivos devido à sua facilidade de obtenção e estabilidade (Bertok et al., 2019). Esses sensores têm a capacidade de detectar tanto carboidratos livres como aqueles presentes nas paredes celulares (Huang et al., 2019), o antígeno específico da próstata (Bertok et al., 2019), o antígeno carcinoembrionário no soro e tecidos (Wang et al., 2018), bem como a detecção de bactérias na água e entre outras aplicações. (Rengaraj et al., 2018).

Do mesmo modo, são fundamentais para detectar biomarcadores e reconhecer patologias, como por exemplo, o câncer e o diabetes. A identificação dos biomarcadores decorre pela comunicação entre lectina e carboidrato, sendo os carboidratos localizados nas membranas celulares do biomarcador. No caso das patologias, como o câncer, será detectado devido a sequência de carboidratos específicos presentes na membrana celular. Na diabetes, será constatado uma crescente quantidade de carboidratos específicos, localizados na corrente sanguínea (Sabu et al., 2019).

### 3.5 Técnicas de Caracterização

Os estudos sobre eletroquímica tiveram início por volta do século XVIII, graças às descobertas de Luigi Galvani. Em um de seus experimentos, ao secar um sapo e acidentalmente colocar placas metálicas em suas terminações nervosas, ele observou que elas contraíam. Esse fenômeno foi uma das principais evidências que impulsionaram pesquisas posteriores, resultando na definição e descoberta da corrente elétrica (Pacheco et al., 2013).

A eletroquímica, definida como a parte da química que lida com as reações químicas envolvendo corrente e potencial elétrico, é uma ciência ampla incorporada à química e multidisciplinar. Estudando as reações químicas que ocorrem na interface entre um condutor de elétrons e um condutor iônico, desempenhando um papel fundamental no avanço científico e na busca por soluções que beneficiem a sociedade (Zanoni et al., 2017).

A eletroquímica utiliza propriedades elétricas mensuráveis, como diferença de potencial e corrente elétrica, para estudar as interações químicas e físicas das espécies redox com os componentes do meio. Essa abordagem levou

ao surgimento das primeiras aplicações práticas, nas quais parâmetros elétricos, como potencial, condutividade e corrente elétrica, podem ser medidos em substâncias específicas. Essas medições são essenciais, pois fornecem resultados importantes para métodos eletroanalíticos, potenciométricos e condutimétricos (Medeiros; Rocha-Filho; Fatibellio-Filho, 2010).

A eletroquímica e a eletroanalítica são áreas que se dedicam ao estudo e aplicação dos métodos de análise química relacionados a fenômenos eletroquímicos. Sendo propriedades elétricas mensuráveis, o que proporciona várias vantagens. Por exemplo, esses métodos exibem uma sensibilidade muito alta, permitindo a detecção de limites extremamente baixos, e também possuem alta especificidade, resultado da oxirredução do analito com base no potencial aplicado. Essas características tornam a eletroquímica uma técnica valiosa para a caracterização, desenvolvimento e aplicação em análises químicas (Zanoni et.al., 2017; Pacheco et.al., 2013).

Os biodispositivos de transdução eletroquímica são extremamente úteis na investigação de microorganismos. Elas permitem a detecção precisa e análise dos microorganismos, incluindo patógenos, através do uso de eletrodos modificados e biossensores. Sua aplicação tem contribuído para o avanço da pesquisa microbiológica e o desenvolvimento de métodos de diagnóstico e monitoramento mais eficientes (Perumal e Hashim, 2014).

No contexto da análise eletroquímica, destaca-se o uso de técnicas como a voltametria cíclica (VC) e a Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS).

### 3.5.1 Voltametria Cíclica (VC)

Essa técnica é desempenhada em uma célula eletroquímica contendo três eletrodos, sendo esses o de trabalho, o contra eletrodo e eletrodo de referência, todos contidos em uma solução eletroanalítica. O desenvolvimento de um potencial elétrico que acarreta em uma diferença de potencial entre os eletrodos de trabalho e auxiliar, possibilita uma transferência de elétrons na interfase do eletrodo de trabalho com a solução eletrolítica, denominado dupla camada elétrica. Diante disso, a variação da corrente elétrica frente a superfície do eletrodo será relacionado pelo empenho do potencial elétrico, dando origem ao voltamograma cíclico (Magarelli, Pupe & Silva, 2021).

A diferenciação entre os parâmetros da voltametria cíclica possibilita uma pesquisa entre o controle do processo devido a reação eletroquímica, como por exemplo velocidade de varredura, número de varreduras potenciais, sendo esses nomeados de ciclos, além das circunstâncias da solução, como o pH e a concentração do analito (Magarelli, Pupe & Silva, 2021). Durante o processo de desenvolvimento do biossensor, é comum utilizar a técnica de voltametria cíclica para controlar a quantidade de material depositado na superfície do eletrodo, o que influencia diretamente na resposta eletroquímica (Araújo, 2018).

Na superfície do eletrodo de trabalho realiza-se a modificação, sobrepondo a superfície com o intuito de aprimorar a condutividade e o fluxo de elétrons, sendo possível observar diferenças nas respostas entre um eletrodo modificado e um não modificado. Essas diferenças ocorrem devido ao processo de modificação superficial realizado no eletrodo modificado, o qual introduz substâncias ou materiais adicionais para melhorar suas propriedades. Essa modificação pode afetar a sensibilidade, seletividade e estabilidade do eletrodo, resultando em respostas distintas em comparação com um eletrodo não modificado. Portanto, a utilização de eletrodos modificados pode proporcionar informações adicionais e um desempenho aprimorado em diversas aplicações eletroquímicas (Leite, 2016).

A técnica de voltametria cíclica tem recebido destaque nesse contexto, devido à sua capacidade de reprodução precisa e por fornecer informações cruciais sobre a cinética de transferência de carga e o potencial redox. Essas informações são utilizadas tanto no desenvolvimento de biossensores quanto na caracterização dos fenômenos físico-químicos relacionados à imobilização de moléculas no eletrodo de trabalho, bem como em todos os processos funcionais de biorreconhecimento (Skoog et al., 2002).

A diferença de potencial entre os eletrodos impulsiona uma reação eletroquímica, sendo esse potencial inicialmente varrido linearmente. Isso resulta na oxidação ou redução de uma espécie química quando o potencial atinge valores específicos na superfície do eletrodo de trabalho, originando uma corrente elétrica. Durante a varredura de potencial, a corrente é medida para quantificar as espécies químicas envolvidas em processos redox por unidade de tempo. Para reações de oxidação, a varredura positiva do potencial no eletrodo provoca a oxidação das espécies redox na interface eletrodo/solução, gerando

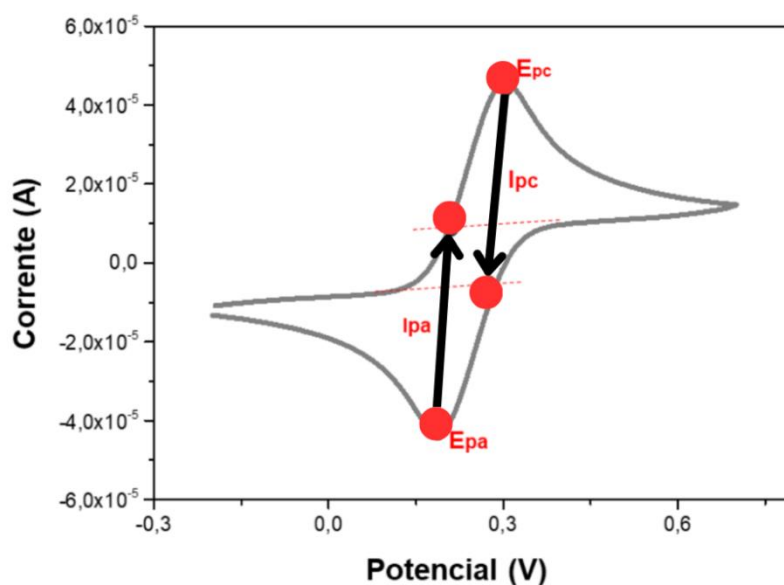
uma corrente oxidativa (ou anódica). À medida que o potencial aumenta, a oxidação torna-se mais favorável termodinamicamente, resultando em um aumento correspondente na corrente (Avelino., 2021).

No entanto, se a difusão das espécies eletroativas para a superfície do eletrodo limita o processo de oxidação, ocorre uma cauda difusional, marcada por uma diminuição na corrente. A varredura de potencial do eletrodo é revertida e movida na direção oposta até atingir o potencial inicial. Quando ocorre um processo de transferência de elétrons quimicamente reversível, a redução das espécies geradas resulta em uma corrente catódica (redutiva), como mostrado no voltamograma da Fig. 14. Ao variar a taxa de varredura do potencial e monitorar as diferenças na resposta de corrente, parâmetros cinéticos, como a corrente de pico anódica ( $i_{pa}$ ) e a corrente de pico catódica ( $i_{pc}$ ), podem ser obtidos (Sandford et al., 2019).

É importante ressaltar que essa técnica permite determinar rapidamente a termodinâmica dos processos redox e a cinética das reações heterogêneas que ocorrem na transferência de elétrons. A Fig. 14 a seguir apresenta os parâmetros fundamentais dessa técnica, incluindo a corrente de pico anódico ( $i_{pa}$ ) e catódico ( $i_{pc}$ ) e o potencial de pico anódico ( $E_{pa}$ ) e catódico ( $E_{pc}$ ). Esses parâmetros são de grande relevância, pois fornecem informações valiosas sobre a interface modificada (Ribeiro et al., 2015).

Além disso, a voltametria cíclica oferece uma maneira relativamente simples de avaliar a reversibilidade do processo pelo qual o eletrodo passa. No primeiro ponto, quando o potencial é aplicado, ocorre a varredura positiva inicial, conhecida como pico catódico. No segundo ponto, a direção é invertida e o potencial aplicado é negativo, referindo-se ao pico anódico.

**Figura 14** - Representação da técnica de voltametria cíclica em uma reação reversível na superfície do eletrodo. Corrente de pico catódico ( $I_{pc}$ ); Corrente de pico anódico ( $I_{pa}$ ); Potencial de pico catódico ( $E_{pc}$ ); Potencial de pico anódico ( $E_{pa}$ ).



Fonte: Próprio autor.

Esses picos são determinados pela equação de Nernst, que leva em consideração o potencial eletroquímico da célula, o potencial padrão de uma espécie e as atividades específicas do analito oxidado e reduzido no sistema (Guerra, 2021). A equação de Nernst oferece dados para diferenciar os potenciais do eletrodo de trabalho (ET) e do eletrodo de referência (ER) após a interação com o analito-alvo, conforme expresso na Equação 1.

$$E = E0 + \frac{RT}{ziF} \ln\left(\frac{a_i^{amostra}}{a_i^{ref}}\right) \quad eq. 1$$

Nessa equação,  $E0$  representa o potencial padrão do ET,  $R$  é a constante universal dos gases,  $T$  é a temperatura absoluta,  $Zi$  é o número de elétrons envolvidos na reação redox,  $F$  é a constante de Faraday,  $a_i^{amostra}$  indica a atividade dos íons na amostra, e  $a_i^{ref}$  refere-se à atividade iônica no ER (Zdrachek; Bakker, 2019).

Essa análise se torna uma ferramenta importante para prever o funcionamento do sistema, especialmente em relação às mudanças de concentração das espécies em solução (Elgrishi et al., 2017).

### 3.5.2 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE)

Essa técnica tem como princípio estabelecer mecanismos que envolvam reações e determinem os principais parâmetros cinéticos. Isso permite a obtenção rápida de resultados experimentais e possibilita a investigação de fenômenos eletroquímicos (Ribeiro et.al., 2015).

Conforme descrito por Damos e colaboradores, os constituintes da impedância de maneira geral está relacionado à descrição dos resultados de sistemas compostos por capacitâncias, resistências e indutâncias. Quando aplicado à eletroquímica, esse conceito ajuda a compreender a relação entre a corrente e o potencial do sistema. Essa abordagem permite analisar e quantificar as interações eletroquímicas dentro do sistema em estudo, levando a uma melhor compreensão dos fenômenos envolvidos (Damos et.al., 2004).

As grandezas são alteradas na espectroscopia de EIE, conforme a construção do biossensor. Além disso, pode ser utilizada para investigar o processo de reconhecimento biológico, determinando os processos de transporte de carga e sua velocidade, a condutividade de filmes, a capacidade redox e da dupla camada, bem como os coeficientes de difusão dos portadores de carga, entre outros parâmetros (Lisdat e Schäfer, 2008).

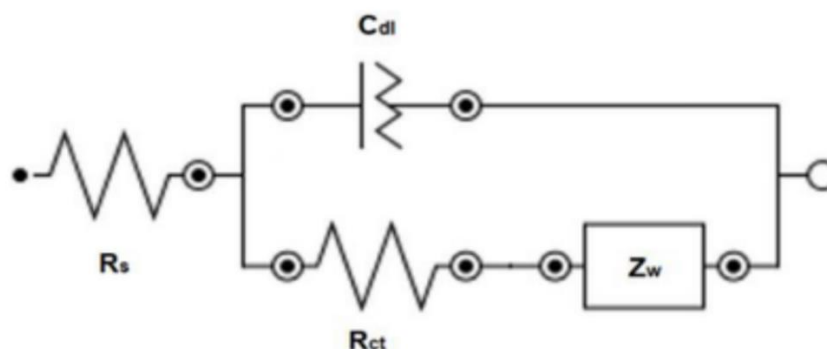
Ela se destaca por ser uma técnica precisa, reprodutível e de alta precisão, fornecendo informações sobre o controle eletroquímico do analito em questão (Ribeiro et.al., 2015).

As respostas obtidas serão medidas em termos de magnitudes, relacionadas à corrente e à frequência. Essas magnitudes estão relacionadas aos componentes presentes na superfície do eletrodo de trabalho, ou seja, aos processos eletroquímicos que ocorrem nessa região (Bard et al., 2001).

A impedância eletroquímica é examinada utilizando circuitos elétricos equivalentes, os quais consideram a relação entre a corrente e o potencial associados ao processo de transferência de carga, capacitância, dupla camada elétrica e a impedância de Warburg (Carvalho e Andrade, 2006), em outras

palavras, todas as informações obtidas por meio da EIE são interpretadas e analisadas por diferentes modelos de medidas, como os circuitos elétricos equivalentes. Esses circuitos são baseados nas características específicas da célula eletroquímica e utilizam elementos como resistores e capacitores, como o circuito de Randles (Choi et al., 2020; Sani et al., 2016), apresentado na Fig. 15. Este modelo é empregado na eletroquímica para elucidar sistemas eletroquímicos. No circuito correspondente, os elementos estão organizados em paralelo devido à corrente total que percorre o sistema eletroquímico. Destacam-se como elementos presentes em um circuito, o CPE, sendo o elemento de fase constante;  $Z_w$ , a impedância de Warburg;  $R_{ct}$  a resistência de transferência de carga e  $R_s$  a resistência da solução (Chang e Park, 2010; Scholz, 2010).

**Figura 15** -Demonstração do circuito equivalente de Randles.



Fonte: Próprio autor

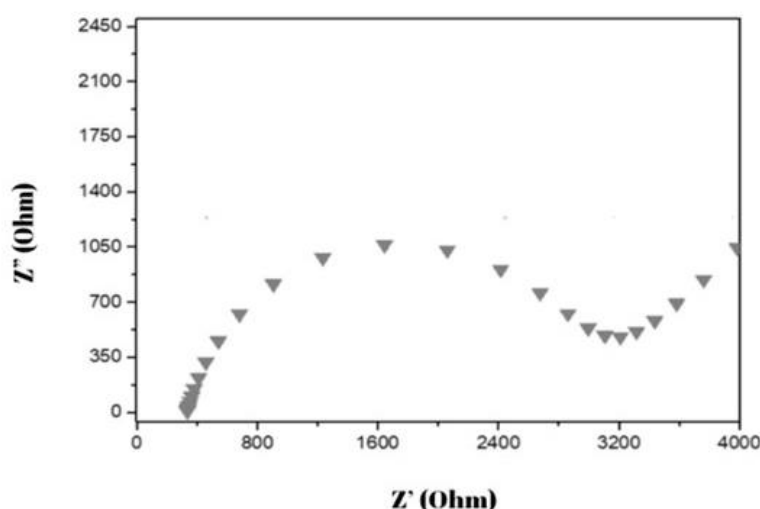
Essa corrente é a soma da corrente faradaica ( $i_f$ ), que está relacionada às reações eletroquímicas, e a corrente de carregamento da dupla camada ( $i_c$ ). Além disso, o elemento  $R_s$ , que representa a resistência da solução, é adicionado em série.  $R_s$  e  $Z_w$  representam as propriedades relacionadas à massa da solução e à difusão da sonda redox. Por outro lado, a  $C_{dl}$  e  $R_{ct}$  dependem das propriedades dielétricas e isolantes na interface entre o eletrodo e a solução (Grossi; Rlccò, 2017).

Eles oferecem uma representação completa da distribuição de potencial elétrico em todo o sistema, permitindo avaliar as reações de transferência de

carga, polarização e outros processos que ocorrem na interface do eletrodo (Damos et.al., 2004; Carvalho e Andrade, 2006).

Quando a corrente atravessa a interface do eletrodo, ocorre uma condução para a solução, resultando em um efeito resistivo devido à migração de íons, o qual é representado pela resistência ( $R_w$ ). Por outro lado, quando elementos capacitivos estão presentes, ocorre um atraso de corrente e potencial, levando à representação em um diagrama com componentes real (resistivo) e imaginário (capacitivo). Como demonstrado na fig. 16, esses componentes são expressos como  $Z'$  (parte real) e  $Z''$  (parte imaginária).

**Figura 16** - Representação esquemática do diagrama de impedância de Nyquist. Relação entre a parte real ( $Z'$ ) e a parte imaginária ( $Z''$ ) da impedância em um sistema eletroquímico.



Fonte: próprio autor.

O cálculo teórico da impedância é obtido a partir da perturbação em um circuito elétrico. Essa perturbação é representada no gráfico pelo componente real ( $Z'$ ) e imaginária ( $Z''$ ) do sistema. A relação entre esses componentes é descrita por meio de uma equação específica, como representado na equação 2, que leva em consideração as propriedades elétricas do sistema em análise. Consideramos a resistência da solução ( $R\Omega$ ), a frequência angular ( $\omega$ ), a capacitância da dupla camada elétrica ( $Cdl$ ) e a resistência de transferência de carga ( $Rct$ ) (Damos et al., 2004). Sendo durante as medições que os compostos

redox-ativos são adicionados à solução, resultando em uma resistência de transferência definida, conhecida como resistência de transferência ( $R_{ct}$ ) (Lisdat e Schäfer, 2008).

$$Z = |Z|(\cos\phi + j\sin\phi) = Z_{re} + jZ_{im} \quad Eq. 2$$

A Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS) tem se destacado como um método preferencial para a caracterização de diversos sistemas, incluindo sensores eletroquímicos, dispositivos de corrosão, entre outros. Apesar da presença de desafios como processos faradáicos, adsorção de substâncias, reações no eletrodo e heterogeneidade das superfícies, sua habilidade de avaliar propriedades elétricas e eletroquímicas a torna uma ferramenta versátil em pesquisas (Damos et al., 2004; Salomão, 2018).

### 3.5.3 Microscopia de Força Atômica

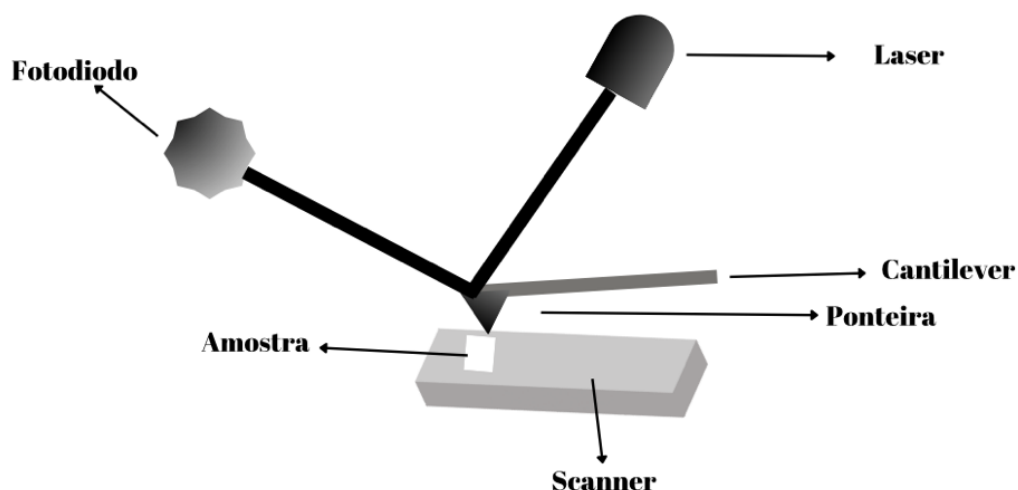
A Microscopia de Força Atômica (AFM) tornou-se importante em várias áreas científicas, incluindo medicina, química e biologia. Sua capacidade de gerar imagens com resolução atômica facilita a análise detalhada da morfologia de superfícies em escala nanométrica (Hartmann, 1997 e Pinto et al., 2013).

A criação do microscópio de força atômica, (Atomic Force Microscope - AFM) desenvolvido por Binnig, Quate e Gerber em 1986, permitiu a mensuração de estruturas e análise com alta definição e exatidão ao nível atômico, tornando-se uma técnica inovadora (Binnig & Quate, 1986).

O microscópio de força atômica demonstra imagens em uma sequência de 5 nm, apresentando dezenas de átomos individuais e imagens em escala de 100  $\mu\text{m}$ . Essa técnica é capaz de trabalhar com materiais rígidos, como superfícies cerâmicas e dispersões de nanopartículas metálicas, mas também com materiais mais delicados, como polímeros altamente flexíveis, células humanas e até mesmo moléculas individuais de DNA (ácido desoxirribonucleico). Ademais o instrumento de imagem possui funções de “espectroscopia”, como calcular amostras com características distintas em nanoescala (Sadewasser e Glatzel, 2018).

Os dados adquiridos pelo AFM são processados de maneira simples para criar imagens que podem ser visualizadas a partir de diversos ângulos usando um software de análise. Isso permite uma medição rápida de parâmetros, como altura, comprimento, largura e volume de todos os elementos da amostra. O modelo representativo do MFA segue na fig. 17 (Eaton & West, 2010).

**Figura 17** - Ilustração representativa da técnica de microscopia de força atômica



Fonte: Próprio autor.

#### 3.5.4 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

O FTIR é uma técnica versátil usada para analisar espécies orgânicas e inorgânicas, permitindo determinar suas propriedades químicas e estruturais. Essa técnica utiliza a interação da radiação eletromagnética com a matéria na região infravermelha do espectro, que abrange um número de onda entre  $12.800\text{ cm}^{-1}$  e  $10\text{ cm}^{-1}$ , ou um comprimento de onda de  $780$  a  $1,0 \times 10^6\text{ nm}$ . Essa faixa do espectro está localizada entre as regiões do visível e das micro-ondas. Quando a radiação incide em uma molécula, ela é absorvida pelas ligações

moleculares. Para isso acontecer, a molécula deve sofrer variações em seu momento dipolo durante os movimentos rotacionais ou vibracionais. Assim, o campo elétrico alternado da radiação tem a capacidade de interagir com a molécula, levando a alterações na amplitude de um de seus movimentos. Isso ocorre quando a frequência da radiação é compatível com a frequência natural de vibração ou rotação da molécula, resultando em absorção da energia e influenciando seu comportamento. Se a frequência da radiação for igual à frequência natural de vibração da molécula, ocorre a absorção, resultando em uma variação na amplitude molecular (Griffiths; De Haseth, 2008; Smith, 2011).

Da mesma forma, a rotação assimétrica da molécula em torno de seus centros de massa gera oscilações periódicas do momento dipolo, permitindo a interação com o campo de radiação. Essa análise pode ser realizada em estados líquidos, sólidos ou gasosos do material em questão (Griffiths; De Haseth, 2008; Smith, 2011).

Um espectrômetro de FT-IR possui componentes essenciais, como uma fonte de luz infravermelha, um interferômetro com um espelho móvel, um detector, um conversor analógico/digital e um computador. A luz da fonte incide sobre o interferômetro, que divide em dois feixes: um atinge um espelho fixo e o outro, um espelho móvel. A variação das distâncias percorridas por esses feixes causa interferências construtivas e destrutivas, resultando em diferentes intensidades de vibração detectadas pelo detector. Através de uma transformação de Fourier, o sinal no domínio do tempo é convertido para o domínio da frequência usando o interferômetro de Michelson. Esse dispositivo divide o feixe de radiação da fonte infravermelha, refletindo-a simultaneamente nos espelhos fixo e móvel. Assim, os feixes de luz refletidos pelos espelhos se sobrepõem, atravessam a amostra e atingem o detector (Stuart, 2004; Griffiths; De Haseth, 2008).

Os dados coletados são convertidos para o formato digital por um conversor analógico/digital e, em seguida, transferidos para o computador, onde são representados graficamente. Esses dados tratados mostram a relação entre a absorbância ou transmitância (%) dos grupos químicos presentes na amostra em relação à frequência ou número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ). Dependendo do tipo de amostra, o espectro pode ser medido no modo de transmitância ou de refletância (Stuart, 2004; Griffiths; De Haseth, 2008).

O FT-IR é uma excelente técnica para a análise estrutural de filmes poliméricos e nanomateriais, além de ser amplamente utilizado em análises de biomoléculas. Esse método possibilita a caracterização estrutural e o monitoramento de alterações bioquímicas em proteínas, polipeptídeos e membranas biológicas (SILVA et al., 2016). Cada molécula apresenta um espectro de absorção único, como uma impressão digital. Após registrar o espectro de infravermelho, o próximo passo é a interpretação, que se baseia nas bandas de absorção relacionadas aos grupos funcionais da molécula, conhecidas como frequência de grupos (Stuart, 2004).

## 4 Materiais e Métodos

### 4.1 Materiais

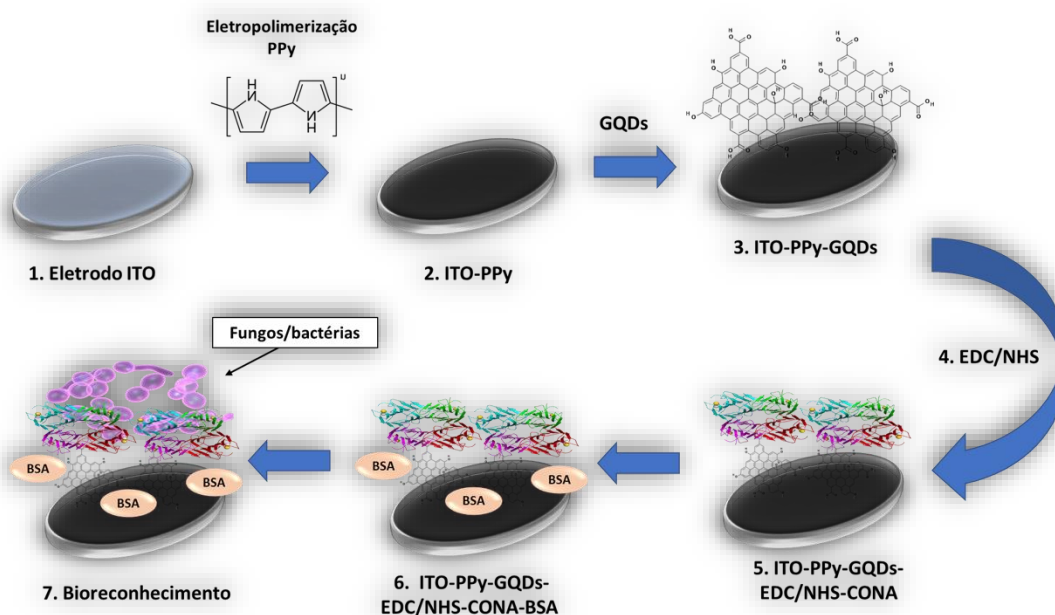
A lectina ConA, GQD, monômero Pirrol, N- hidroxisuccinimida (NHS), hidrocloreto de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil] carbodiimida (EDC), Ferricianeto de potássio ( $K_3[Fe(CN)_6]$ ) ferrocianeto de potássio ( $K_4[Fe(CN)_6]$ ), Albumina de soro bovino (BSA) foi obtida da Sigma-Aldrich (EUA). A resistividade da superfície do ITO é de  $20 \Omega / sq$ . Os microrganismos foram fornecidos pelo Prof. Reginaldo Gonçalves de Lima Neto do Departamento de Medicina Tropical/UFPE, que possui as atividades de seu laboratório devidamente autorizadas pelo comitê de ética da UFPE. A água ultrapura utilizada no desenvolvimento dos experimentos foi fornecida pelo sistema Millipore Milli-Q (Billerica, EUA). Em adição, todos os reagentes e solventes foram de grau analítico.

### 4.2 Montagem do sistema sensor PPy-GQD-Lectina

O primeiro passo para a construção do biossensor compreende na eletropolimerização do pirrol sobre o eletrodo flexível de ITO. Com esse propósito, o eletrodo flexível foi submerso em uma solução com 20ml contendo 0.5 M de ácido clorídrico (HCl) e 30 mM de pirrol. Por meio da técnica de VC, seis ciclos foram utilizados para a polimerização em uma faixa de potencial de -0,4 a +1,0 V com velocidade de varredura de  $100 \text{ mV.s}^{-1}$  (Avelino et al., 2021;

Oliveira et al.,2023). Em seguida, 5  $\mu\text{L}$  dos GQD foram adsorvidos sobre a camada do PPy no período de 10 minutos. Posteriormente, 2  $\mu\text{L}$  de EDC:NHS (0,4M e 0,1 M, 1:1, v/v) foi adicionado na superfície do eletrodo durante de 20 minutos, a fim de favorecer a ligação química do PPy e GQD (Oliveira et al.,2023). Logo, 5  $\mu\text{L}$  da ConA foi imobilizada sobre a superfície da camada PPy-GQD no tempo de 15 minutos, após ativação mediada por EDC:NHS destacado anteriormente (Simão et al., 2020). Para o bloqueio dos sítios ativos remanescentes foi utilizada 2  $\mu\text{L}$  da solução de BSA a 1%(p/v) por 30 segundos. Com isso, através dos métodos realizados, foi possível o desenvolvimento de um eletrodo flexível em uma plataforma nanoestruturadas por PPy-GQD-ConA. Como demonstrado na ilustração do processo de montagem do sistema sensor na fig. 18.

**Figura 18** - Representação esquemática do biossensor.



Fonte: Próprio autor.

#### 4.3 Medidas de impedância eletroquímica

Para realizar os experimentos de EIE, será utilizado um potenciostato/galvanostato (Metrohm Autolab, Holanda). A medição foi realizada em uma célula convencional de três eletrodos, sendo o contraeletrodo (CE), eletrodo de trabalho (ET) e o eletrodo de referência (ER). O eletrodo em ITO (ET) foi modificado com PPy-GQD-Lectina, enquanto o eletrodo de platina será utilizado como contra eletrodo (CE). O eletrodo de referência (ER) foi de Ag/AgCl saturado com KCl. As análises impedimétricas foram conduzidas na presença de uma solução contendo ferro-ferricianeto de potássio ( $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ ) na proporção de 1:1. Foi utilizada uma faixa de frequência que vai de 100 mHz a 100 KHz, com um potencial de amplitude alternada de 10 mV (Oliveira et al., 2011a; Oliveira et al., 2011b).

Após a obtenção dos gráficos de impedância eletroquímica, também conhecidos como Diagrama de Nyquist, eles foram analisados utilizando o programa EQUIVCRT (Andrade et al., 2011). Por meio desse programa, foram geradas curvas teóricas que representam o comportamento interfacial do sistema PPy-GQD-Lectina.

#### 4.4 Microscopia de força atômica

As modificações nas superfícies dos eletrodos funcionalizados antes e após a identificação do analito alvo foram analisadas topograficamente utilizando um microscópio de força atômica modelo SPM-9700 (Shimadzu, Japão). Para essa finalidade, foi utilizado um cantilever ajustado no modo não-contato.

#### 4.5 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

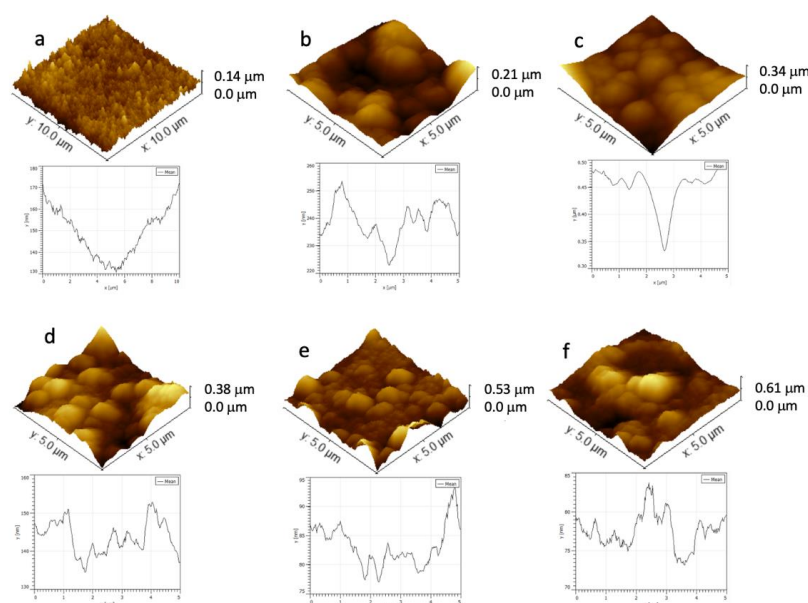
Foram feitas medições utilizando a técnica de espectroscopia infravermelha com transformada de Fourier (FTIR) na faixa de  $650\text{ cm}^{-1}$  a  $4000\text{ cm}^{-1}$ , com uma resolução de  $2\text{ cm}^{-1}$ . Um espectrômetro Agilent Cary 630 FTIR (Agilent Technologies, Rowville, Austrália) foi utilizado. Os experimentos foram conduzidos a uma temperatura de  $21^\circ\text{C}$  e com 50% de umidade relativa.

## 5 Resultados e discussão

### 5.1 Análise topográfica

Conforme apresentado na fig. 19, essa técnica complementar possibilita uma avaliação das mudanças que acontecem nas superfícies do eletrodo. Dito isso, as alterações no eletrodo foram analisadas observando as rugosidades em sua superfície (Atta et. al., 2012). A rugosidade da amostra foi analisada utilizando medidas como a rugosidade média (Ra) e a raiz quadrada média (Rq).

**Figura 19** – Microscopia de força atômica obtidas do eletrodo em ITO modificado por PPy (a), PPy-GQDs (b), PPy-GQDs-ConA (c), PPy-GQDs-ConA-BSA (d), PPy-GQDs-ConA-BSA-*E.coli* (e), PPy-GQDs-ConA-BSA-*C.albicans* (f).



Fonte: Próprio autor.

Uma camada única do filme PPy, após a eletropolimerização no substrato em ITO foi percebida de forma homogênea na superfície do eletrodo, com alturas médias de 0,14  $\mu\text{m}$  (fig. 19a), sendo  $R_{ms} = 25.92$  e  $R_q = 19.0$ . Segundo estudos anteriores relatados na literatura, a rugosidade observada é típica de filmes do PPy com uma superfície nodular (Avelino et al., 2022). A adsorção dos GQD levou a um aumento na rugosidade do sistema, com um tamanho de 0,21  $\mu\text{m}$ , o

que indica que esses GQD consistem em 1 a 3 camadas de grafeno (Fig. 19b), sendo  $R_{ms} = 31.58$  e  $R_q = 24.23$ . Este pequeno aumento pode ser resultado da agregação de GQDs no filme do PPy (Oliveira et al., 2023). Posteriormente, a imobilização da ConA resultou em um aumento adicional  $0,34 \mu m$  (Fig. 19c), sendo  $R_{ms} = 56.62$  e  $R_q = 46.71$  (ANDRADE et al., 2015; SÁ et al., 2020). O bloqueio dos sítios remanescente, ocorreu devido a utilização do BSA, demonstrando um aumento da rugosidade, com alturas de  $0,38 \mu m$  (Fig. 19d), sendo  $R_{ms} = 61.32$  e  $R_q = 53.4$ .

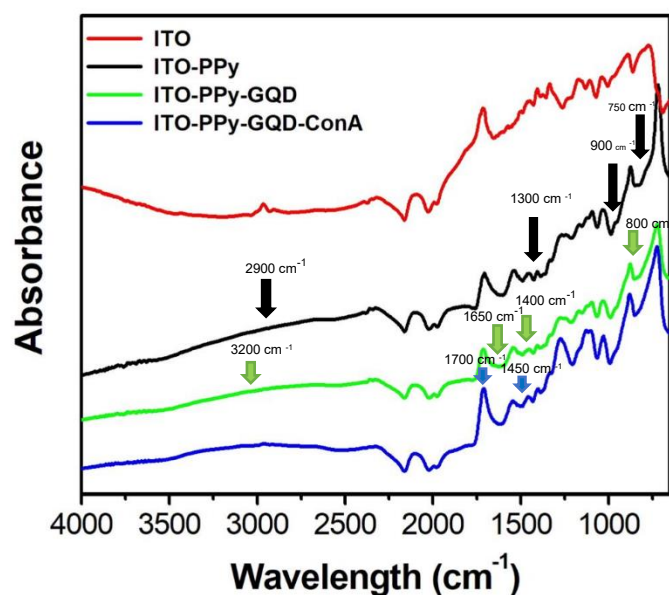
O sistema PPy-GQDs-ConA demonstrou uma interação significativa com os microrganismos, sendo *E. coli* atingindo uma altura média de  $0,53 \mu m$  ( $R_{ms} = 111.1$  e  $R_q = 90.9$ ) e *C. albicans* atingindo uma altura média de  $0,61 \mu m$  ( $R_{ms} = 127.6$  e  $R_q = 96.3$ ), respectivamente (Fig. 19e,f). Durante o processo de bioreconhecimento, foi notada a formação de uma densa camada adsorvida na superfície do sensor (Silva et al., 2021). A diferença na altura dos dados é atribuída à formação do complexo lectina-microrganismos, indicando que o sensor foi capaz de reconhecer os analitos.

## 5.2 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier

Em adição, foram apresentadas as medições de FTIR (Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier) para identificar e caracterizar os picos espectrais relacionados aos materiais na construção da plataforma sensora. Isso proporcionando uma observação sobre a composição e propriedades envolvidas.

Após a polimerização, no espectro FTIR foram identificados picos do PPy, localizadas conforme mostrado na fig. 20, espectro vermelho. Esses picos localizados em  $2900 \text{ cm}^{-1}$  aproximadamente, demonstram ligações de N-H (Avelino et al., 2021). Outros picos característicos são encontrados em  $1300 \text{ cm}^{-1}$ ,  $900 \text{ cm}^{-1}$  e  $750 \text{ cm}^{-1}$  aproximadamente, apontando ligações internas no anel C5C e entre os anéis C-CC-C, C-H (deformação fora do plano) e C-H (Flexão externa), respectivamente (Costa et al., 2013).

**Figura 20** - Acompanhamento FTIR da fabricação da plataforma.



Fonte: Próprio autor.

Em suma, no espectro FTIR de PPy-GQDs foi possível observar dois picos em  $1650\text{ cm}^{-1}$  e  $3200\text{ cm}^{-1}$  aproximadamente, demonstrando ligação de O-H. Outros picos espectrais entre  $1400\text{ cm}^{-1}$  e  $800\text{ cm}^{-1}$  aproximadamente, indicando ligações de C-H e C-O respectivamente, espectro azul (Tabish et al., 2018).

Na análise de FTIR de PPy-GQDs-ConA foram detectados picos característicos em torno de  $1700\text{ cm}^{-1}$  e  $1450\text{ cm}^{-1}$  aproximadamente, sendo associado ao grupo carbonila e o grupo amino presente na proteína, sendo o espectro rosa (Pedroso et al., 2008; Kilicay et al., 2016).

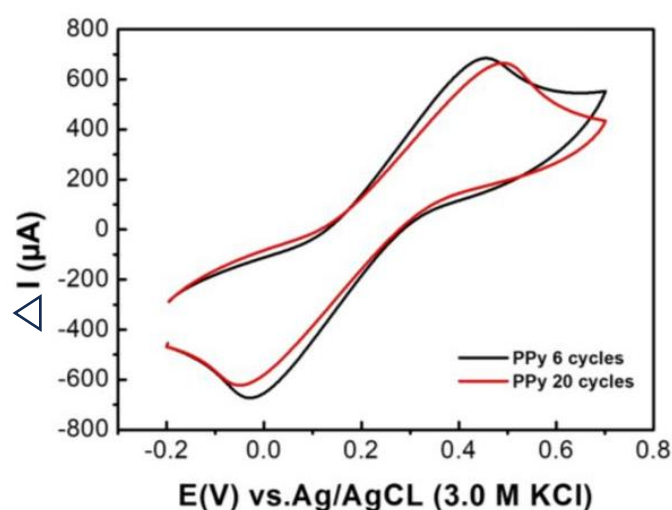
Diante disso, após a imobilização da ConA, foi constatado que os sinais do PPy e o GQDs permaneceram predominantes. Isso indica que o PPy e o GQDs mantiveram suas estruturas e funcionalidades mesmo após o processo de imobilização da ConA na plataforma do biossensor.

### 5.3 Caracterização eletroquímica

#### 5.3.1 Padronização de Eletropolimerização e Nanoestruturação

A pesquisa teve início com uma análise detalhada do ciclo ideal de eletropolimerização específico para o polipirrol (PPy). A eletropolimerização desse polímero apresentou vantagens notáveis devido à sua estabilidade, controle de espessura, oxidação do polímero e formação de um filme eletrocatalítico ativo (Tang et al., 2020). O estudo se concentrou na resposta voltamétrica do filme obtido em 6 e 20 ciclos de eletropolimerização, revelando que o filme de PPy formado em 20 ciclos exibiu correntes de pico mais baixas em comparação com o filme formado em 6 ciclos. (21a e 21b). Essa diferença foi atribuída ao consumo de monômero, afetando a espessura e condutividade das camadas externas do filme (Mabrouk, 2005). Como resultado, o 6º ciclo foi considerado ideal devido à sua estabilidade e valores mais elevados de correntes de pico anódicas e catódicas na voltametria cíclica, seguindo uma escolha alinhada com padrões estabelecidos em pesquisas anteriores (Avelino et al., 2021).

**Figura 21** - Voltametria Cíclica do PPy

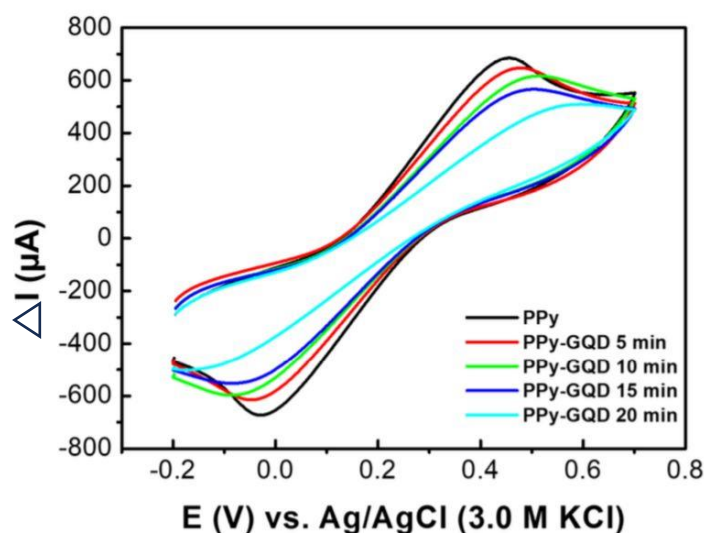


Fonte: Próprio autor.

Na segunda fase da construção do biossensor, os pontos quânticos GQDs foram atraídos e fixados na superfície do polipirrol (PPy). Essa atração resulta

da interação entre o polímero carregado positivamente e os grupos carboxílicos carregados negativamente nos GQDs (Oliveira et al., 2023; Ristić et al., 2014; Yaghoubi et al., 2020; Tang et al., 2020; Mabrouk, 2005; Jaiswal et al., 2018). Um estudo do tempo de adsorção dos GQDs indicou que períodos mais longos resultaram em reduções mais acentuadas nas correntes anódicas e catódicas nos ensaios de VC, como demonstrado na fig. 22 (Oliveira et al., 2023; Avelino et al., 2020). Portanto, optou-se por um tempo de adsorção de 15 minutos, ideal para manter o sinal amperométrico sem perdas significativas e permitir a formação de uma camada nanoestruturada satisfatória.

**Figura 22** - Estudo eletroquímico do tempo ideal para imobilização dos GQDs



Fonte: Próprio autor.

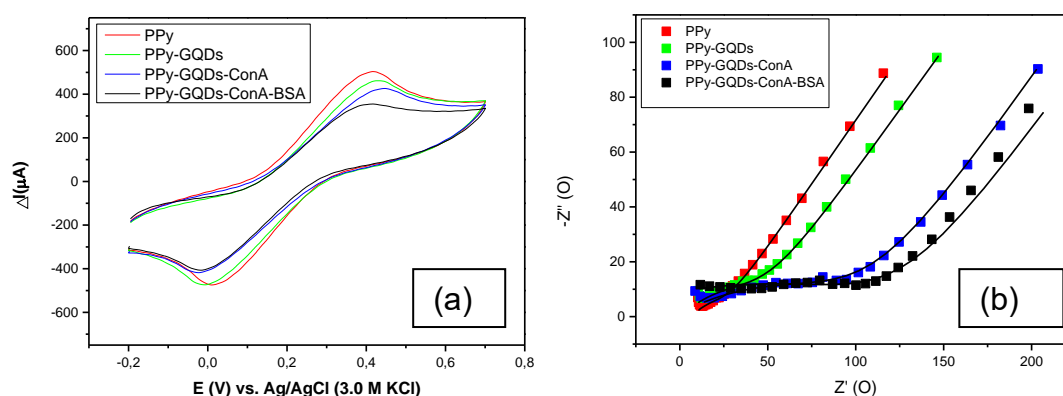
### 5.3.2 Caracterização do biossensor PPy-GQDs-ConA-BSA

Na Figura 23 a e b, são apresentados o voltamograma cíclico e o espectro de impedância para cada etapa de montagem do biossensor flexível. Um exemplo de aplicação de filme de polipirrol no desenvolvimento de biossensores é o uso na investigação do mecanismo de armazenamento de carga de eletrodos compostos, conforme apontado pelo estudo de Ajjan e colaboradores (Ajjan et al., 2015). Além disso, o PPy também tem sido utilizado na detecção do

Papilomavírus Humano (HPV), devido às suas propriedades mecânicas e seu caráter intrinsecamente condutor, conforme destacado (por Avelino et al., 2021).

É possível observar que o eletrodo ITO após a eletropolimerização do PPy, apresenta uma alta densidade de corrente e resposta amperométrica significativa ( $IPA = 280,78 \mu A$ ). Os resultados impedimétrico também revelaram um comportamento característico pela baixa resistência à transferência de carga ( $RCT = 31,23 \Omega$ ) (Oliveira et al., 2023; Avelino et al., 2020).

**Figura 23** – Voltamograma cíclico (a) e diagrama de Nyquist (b) da etapa de modificação do eletrodo através do sistema PPy-GQDs-ConA: Eletropolimerização do PPy (1), PPy-GQDs (2), PPy-GQDs-ConA (3), PPy-GQDs-ConA-BSA (4).



Fonte: Próprio autor.

É relevante ressaltar que quando ocorre o processo de oxidação na superfície do eletrodo de trabalho, um filme polimérico estável é formado. Esse filme possui algumas características importantes, como a espessura que pode ser controlada de acordo com as condições de oxidação, exibindo uma alta condutividade elétrica (Avelino et al., 2021).

Após a adsorção do GQDs, foram observadas alterações significativas, como uma diminuição na oxidação anódica, com o valor de corrente de pico ( $IPA = 259,0 \mu A$ ) (Fig. 23a), e um aumento nas propriedades resistivas ( $RTC = 65,66 \Omega$ ) (Fig. 23b). Os resultados obtidos estão em total concordância com pesquisas anteriores e fornecem indícios de que os GQDs, graças à sua ampla área de superfície contribuem para modificação química (Razmi et al., 2013).

Dessa maneira, têm sido observados artigos que exploram o uso dos GQDs na construção de sistemas biossensores, com o objetivo de aumentar a sensibilidade na detecção. Como exemplo de aplicação, Parisa e Razmi utilizaram GQDs para criar um biossensor capaz de detectar resíduos de pesticidas e a capacidade de absorção da enzima glicose oxidase, respectivamente, apresentando características semelhantes ao biossensor desenvolvido nessa pesquisa (Parisa et al., 2019; Razmi et al., 2013).

A adsorção de GQDs no filme PPy ocorre diante da atividade eletrostática do polímero catiônico com o COOH carregado negativamente nos pontos quânticos (Jaiswal et al., 2018). Dessa forma, os GQDs aprimoram a eficiência da transferência de carga do PPy durante a reação catódica do sistema sensor (Chen et al., 2013).

A etapa seguinte envolve a imobilização da ConA sobre a superfície sensora PPy-GQDs. Durante a análise do voltamograma cíclico, foi notada uma redução na resposta amperométrica do sistema ( $IPA = 228,94 \mu A$ ) (figura 23a) e um subsequente aumento da impedância total do sistema ( $RCT = 170 \Omega$ ) (figura 23b). Sendo possível observar o declínio dos picos voltamétricos pela baixa transferência de elétrons, devido a imobilização da ConA (Sá et al., 2020).

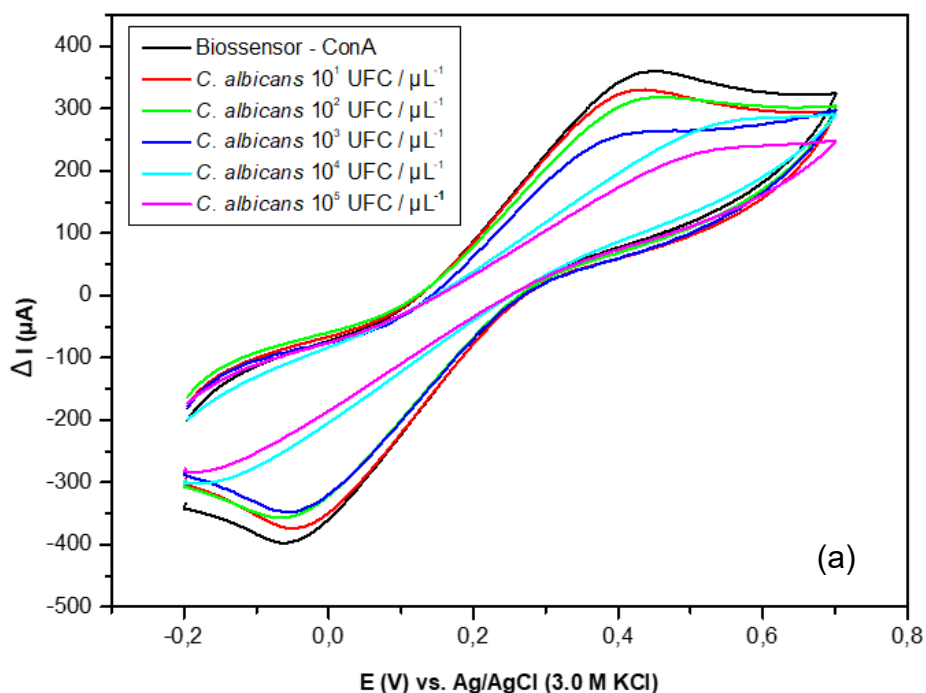
Em decorrência disso, têm sido observados artigos que exploram o uso das lectinas em biossensores para a detecção de microrganismos. Trabalhos relevantes, como o de Sá, Silva e colaboradores, que empregaram a lectina ConA no desenvolvimento de um biossensor com a capacidade de se ligar a carboidratos específicos, sendo sacarídeos como a N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc), D-frutose, D-glicose (Glc) e, especialmente,  $\alpha$ -D-manose. A utilização de elementos de reconhecimento de especificidade estreita é notável devido à sua capacidade de detecção que se baseia na interação com componentes estruturais ou diversas biomoléculas (Barre et al., 2019), ou seja a ConA e outras lectinas têm sido usadas para direcionar carboidratos e glicoproteínas específicas em estruturas celulares distintas (Sá et al., 2020; Silva et al., 2022).

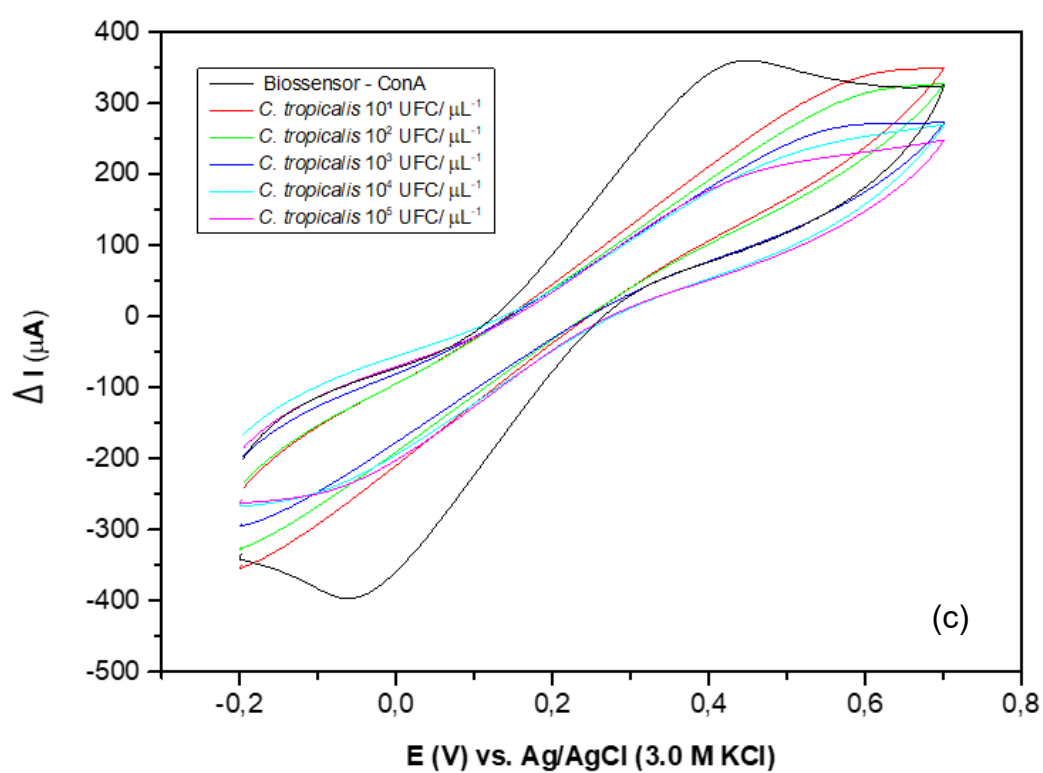
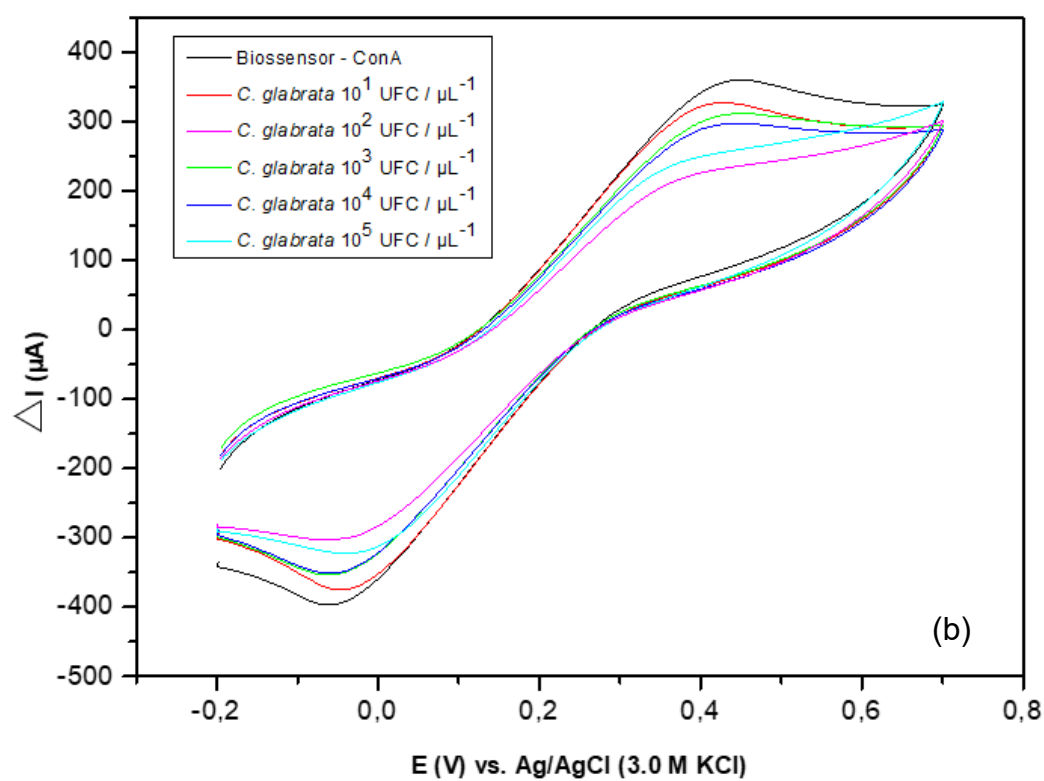
Com o propósito de inativar os sítios ativos restantes, o BSA foi introduzido neste sistema sensor, resultando na diminuição da condutividade ( $IPA = 200,44 \mu A$ ) e no aumento da resistência impedimétrica ( $RCT = 243 \Omega$ ). Os valores dos elementos do circuito de Randles são apresentados na Tabela 4.

#### 5.4 Caracterização eletroquímica da detecção das espécies de *Cândida spp* pelo biossensor PPy- GQDs-ConA-BSA

Os voltamogramas cíclicos e diagramas de Nyquist do biossensor exposto a diferentes concentrações das espécies de *Cândida spp* (*C. albicans*, *C. glabata* e *C. tropicalis*) são apresentados nas Figuras 24 e 25 (a-c). Após a modificação do eletrodo com o BSA os picos do voltamograma mostraram uma diminuição sequencial, assim como o um aumento sequencial no diâmetro do semicírculo que ocorreu entre o limite de detecção ( $10^1$  a  $10^5$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ ) realizado pela plataforma do biossensor. Apresentados na tabela 4, estão os valores referente aos elementos do circuito de Randles.

**Figura 24** - Voltamograma cíclico do sistema sensor, seguido pela resposta eletroquímica após entrar em contato com a *Candida albicans* (a), *Candida glabata* (b) e *Candida tropicalis* (c) ( $10^1$  a  $10^5$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ ).





Fonte: Próprio autor.

Em suma, o grau de reconhecimento pode ser avaliado após a interação com espécies microbianas, considerando os parâmetros obtidos na resposta voltamétrica. Sendo calculado a porcentagem de variação da corrente anódica, representada por  $\Delta I$  (De Miranda et al., 2017), como apresentado na equação 3.

$$\Delta I (\%) = \frac{\left(\frac{1}{I_b}\right) - \left(\frac{1}{I_a}\right)}{\left(\frac{1}{I_b}\right)} \times 100 \quad \text{Eq. 3}$$

Sendo  $I_a$  que representa a corrente máxima observada após a imobilização da ConA, enquanto  $I_b$  é a corrente máxima que ocorre após a interação da ConA com o alvo biológico.

A ligação entre Lectinas e microorganismos revelou que a *Cândida tropicalis* (Figura 24a-c) apresentou uma resposta voltamétrica e impedimétrica maior em comparação com as outras cândidas. Isso ocorreu devido à ConA se ligar a um maior número de carboidratos específicos, como N-acetil-D-glicosamina, D-frutose, D-glicose e especialmente,  $\alpha$ -D-manose, presentes em sua superfície, o que resultou em uma maior resistência na transferência de carga durante o processo de detecção (Sá et al., 2020; Valanda et al., 2022). A porcentagem de desvio relativo indica a magnitude da biodetecção exibida pelo eletrodo (Costa et al., 2014), sendo representada na Tabela 3.

A Tabela 3, apresenta o  $\Delta I$  do eletrodo modificado PPy-GQDs-ConA-BSA após entrar em contato com diferentes concentrações de espécies de cândidas. Os resultados revelaram um aumento gradual nos valores de  $\Delta I$ , à medida que a concentração da Cândida aumentava.

Esse processo de biorreconhecimento é baseado na variação da corrente de pico devido ao bloqueio do processo redox na interface entre o eletrodo e a solução, resultante da interação ConA-Candida. Além disso, tanto os picos catódicos quanto os anódicos diminuíram de acordo com o aumento dos valores de  $\Delta I$ .

**Tabela 3** - Corrente relativa ( $\Delta I$ ) do sistema biossensor após a interação com as espécies fungicas em diferentes concentrações (10<sup>1</sup> a 10<sup>5</sup> UFC mL<sup>-1</sup>).

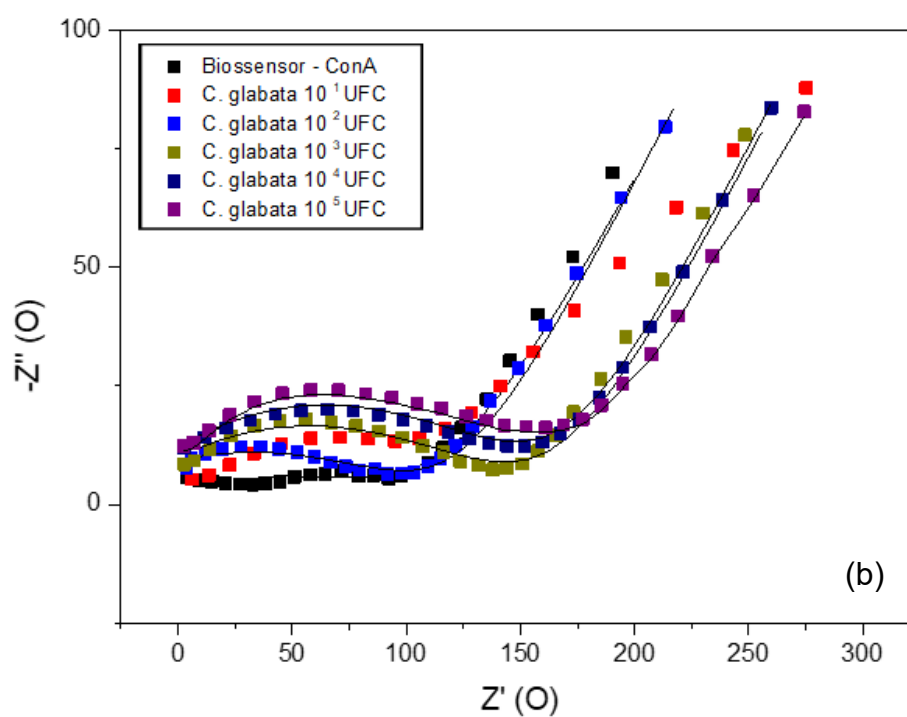
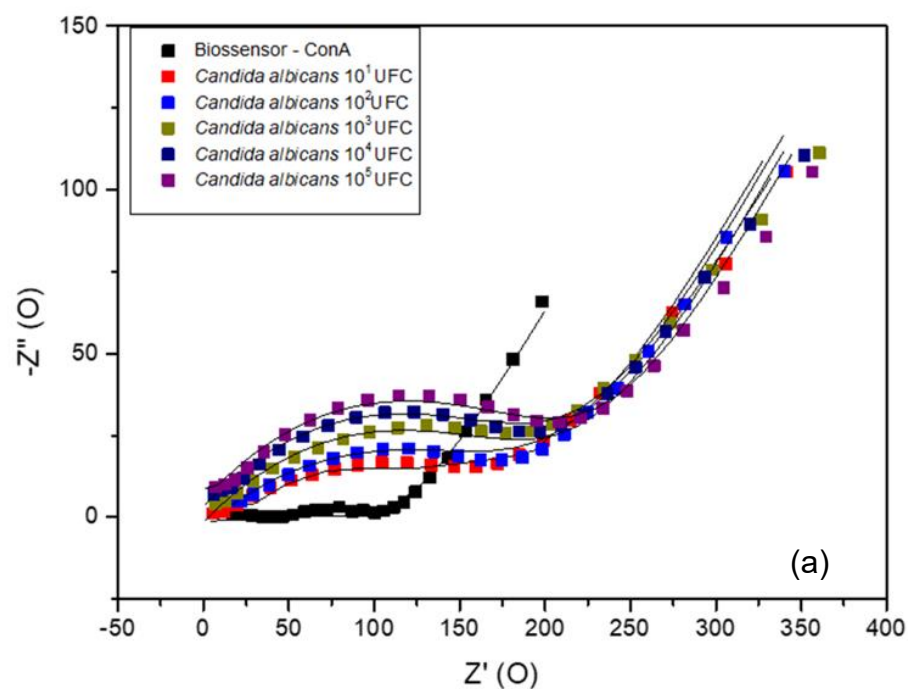
| Concentração (UFC/mL <sup>-1</sup> ) | Ipa( $\mu$ A)     | $\Delta I$ (%) |
|--------------------------------------|-------------------|----------------|
| ITO-PPy-GQDs-ConA-BSA                | 200.44 $\pm$ 1.91 | -              |
| <b><i>Candida albicans</i></b>       |                   |                |
| 10 <sup>1</sup>                      | 146.31 $\pm$ 5.16 | 27%            |
| 10 <sup>2</sup>                      | 124.86 $\pm$ 1.17 | 37,70%         |
| 10 <sup>3</sup>                      | 107.68 $\pm$ 3.02 | 40,39%         |
| 10 <sup>4</sup>                      | 70.46 $\pm$ 3.31  | 64,84%         |
| 10 <sup>5</sup>                      | 61.97 $\pm$ 1.54  | 69,08%         |
| <b><i>Candida glabrata</i></b>       |                   |                |
| 10 <sup>1</sup>                      | 183.73 $\pm$ 1.65 | 8,33%          |
| 10 <sup>2</sup>                      | 154.09 $\pm$ 1.38 | 23,12%         |
| 10 <sup>3</sup>                      | 139.10 $\pm$ 1.47 | 25,54%         |
| 10 <sup>4</sup>                      | 107.72 $\pm$ 1.70 | 46,25%         |
| 10 <sup>5</sup>                      | 96.37 $\pm$ 1.58  | 51,91%         |
| <b><i>Candida tropicalis</i></b>     |                   |                |
| 10 <sup>1</sup>                      | 63.67 $\pm$ 3.32  | 68,23%         |
| 10 <sup>2</sup>                      | 55.18 $\pm$ 4.30  | 72,47%         |
| 10 <sup>3</sup>                      | 40.94 $\pm$ 7.90  | 79,57%         |
| 10 <sup>4</sup>                      | 30.95 $\pm$ 5.77  | 84,55%         |
| 10 <sup>5</sup>                      | 25.55 $\pm$ 1.20  | 87,24%         |

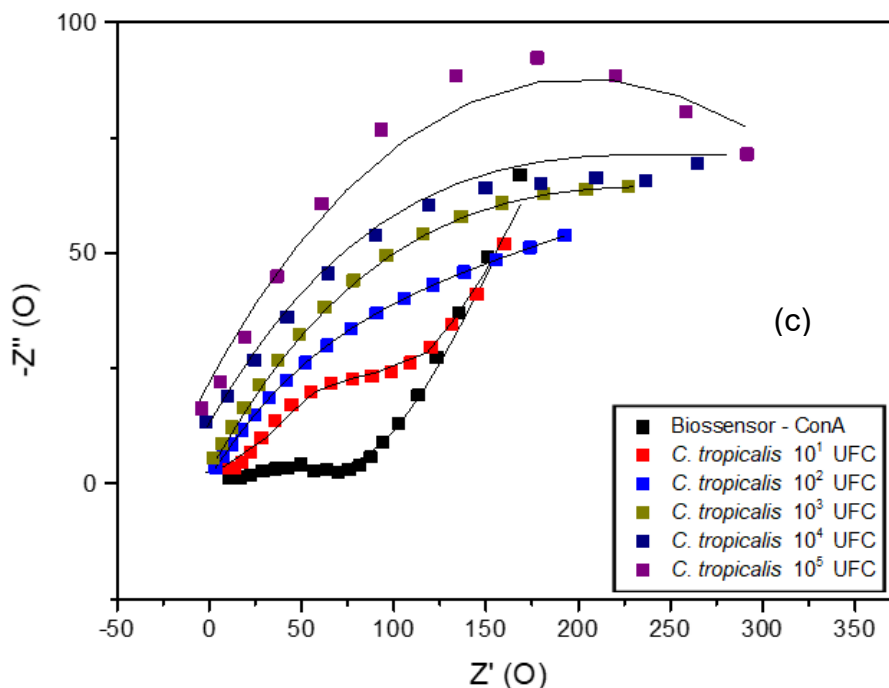
Fonte: Próprio autor.

De acordo com os resultados apresentados na tabela 3, foi observado que o biossensor ConA possui a capacidade de reconhecer diversas espécies de cândidas em diferentes concentrações.

Para as *Candidas* spp os limites de detecção (LOD) e limite de quantificação (LQ) obtidos foram respectivamente, 1.42 e 2.3 UFC/mL para *C. albicans* com regressão linear  $y = 0.079 + 0.16 \text{ Log}(x)$  e  $R^2 = 0.97$ . A *C. glabrata* obteve LOD = 3.72 UFC/mL e LQ = 5.59 UFC/mL com equação da reta  $y = 0.008 + 0.15 \text{ Log}(x)$  e  $R^2 = 0.92$ . Para *C. tropicalis* LOD = 0.18 UFC/mL e LQ = 0.13 UFC/mL com equação da reta  $y = 0.278 + 0.071 \text{ Log}(x)$  e  $R^2 = 0.99$ .

**Figura 25** - Diagramas de Nyquist do sistema sensor, seguido pela resposta eletroquímica após entrar em contato com a *Candida albicans* (a), *Candida glabata* (b) e *Candida tropicalis* (c) ( $10^1$  a  $10^5$  UFC mL<sup>-1</sup>).





Fonte: Próprio autor.

Dessa forma, para avaliar o desempenho do biossensor na detecção das cândidas, utiliza-se a variação relativa do  $R_{ct}$  ( $\Delta R_{ct}$ ). Como apresentado na equação 4.

$$\Delta R_{ct}(\%) = \frac{R_{ct}(\text{microrog}) - R_{ct}(\text{biossensor})}{R_{ct}(\text{biossensor})} \times 100 \quad \text{Eq. 4}$$

Onde  $R_{ct}$  (sensor) representa a resistência à transferência de carga do biossensor PPy-GQDs-ConA-BSA antes de ser exposto às diversas concentrações de bactérias. Já  $R_{ct}$  (microg) indica o valor da resistência obtida após a exposição do biossensor a amostras de fungos *Candida* spp e bactérias gram-negativas e positivas.

A figura 26, exibe o efeito das concentrações nas mudanças do  $\Delta R_{ct}$ . São mostrados os resultados da interação do biossensor com diferentes concentrações de cândidas ( $10^1$  a  $10^5$  UFC mL<sup>-1</sup>).

No estudo, observou-se que os resultados apresentaram um aumento gradual nos valores de  $\Delta R_{ct}$  à medida que a concentração da *Candida*

aumentava. Isso significa que a ConA possui competência em identificar diferentes estruturas presentes nas espécies de *Candida spp* (Sá et al.,2020).

**Tabela 4** - Elementos do circuito equivalente obtidos a partir da impedância elétrica.

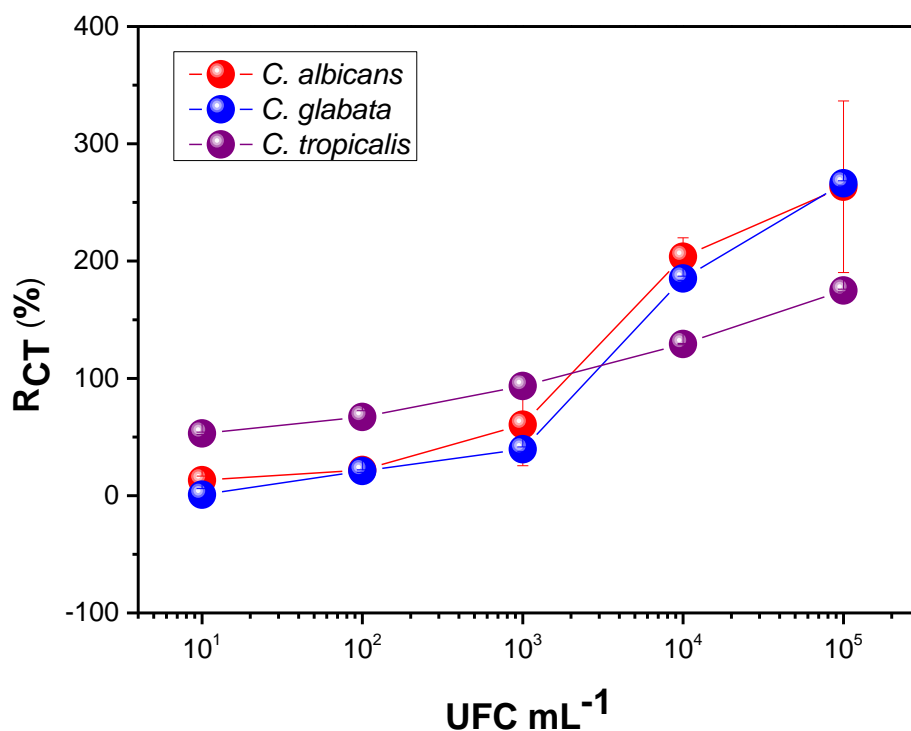
| Sistema                                 | Rct ( $\Omega$ )                 | W                | CPE ( $\mu F$ )  | Rs ( $\Omega$ )  | n                 |
|---|----------------------------------|------------------|------------------|------------------|-------------------|
| ITO-PPy-GQDs-<br>ConA-BSA               | 243 $\pm$ 5.71                   | 9.19 $\pm$ 4.33  | 6.26 $\pm$ 0.2   | 285 $\pm$ 1.88   | 0.210 $\pm$ 0.15  |
| Concentração<br>(UFC.mL <sup>-1</sup> ) | <b><i>Candida albicans</i></b>   |                  |                  |                  |                   |
| 10 <sup>1</sup>                         | 276 $\pm$ 7.03                   | 7,38 $\pm$ 0.13  | 614 $\pm$ 434.72 | 379 $\pm$ 0.94   | 0,284 $\pm$ 0.008 |
| 10 <sup>2</sup>                         | 298 $\pm$ 8.37                   | 7,02 $\pm$ 0.17  | 864 $\pm$ 372.40 | 857 $\pm$ 7.11   | 0,202 $\pm$ 0.008 |
| 10 <sup>3</sup>                         | 343 $\pm$ 69.31                  | 6,81 $\pm$ 0.23  | 413 $\pm$ 292.05 | 532 $\pm$ 158.16 | 0,166 $\pm$ 0.02  |
| 10 <sup>4</sup>                         | 711 $\pm$ 39.13                  | 11,2 $\pm$ 5.27  | 127 $\pm$ 60.13  | 171 $\pm$ 4.64   | 0,102 $\pm$ 0.01  |
| 10 <sup>5</sup>                         | 788 $\pm$ 177.70                 | 7,01 $\pm$ 3.30  | 393 $\pm$ 188.27 | 155 $\pm$ 53.72  | 0,058 $\pm$ 0.02  |
|   | <b><i>Candida glabrata</i></b>   |                  |                  |                  |                   |
| 10 <sup>1</sup>                         | 252 $\pm$ 10.37                  | 8,71 $\pm$ 0.014 | 296 $\pm$ 3.39   | 265 $\pm$ 1.24   | 0,276 $\pm$ 0.002 |
| 10 <sup>2</sup>                         | 294 $\pm$ 2.05                   | 9,17 $\pm$ 0.02  | 355 $\pm$ 27.53  | 226 $\pm$ 2.35   | 0,251 $\pm$ 0.002 |
| 10 <sup>3</sup>                         | 336 $\pm$ 4.02                   | 9,11 $\pm$ 0.004 | 192 $\pm$ 3.39   | 223 $\pm$ 2.86   | 0,292 $\pm$ 0.003 |
| 10 <sup>4</sup>                         | 690 $\pm$ 3.77                   | 5,16 $\pm$ 0.004 | 554 $\pm$ 3.91   | 209 $\pm$ 3.29   | 0,429 $\pm$ 0.001 |
| 10 <sup>5</sup>                         | 887 $\pm$ 4.24                   | 5,01 $\pm$ 0.003 | 701 $\pm$ 4.71   | 315 $\pm$ 0.94   | 0,378 $\pm$ 5.55  |
|   | <b><i>Candida tropicalis</i></b> |                  |                  |                  |                   |
| 10 <sup>1</sup>                         | 372 $\pm$ 2.05                   | 7,90 $\pm$ 0.11  | 578 $\pm$ 1.96   | 101 $\pm$ 2.22   | 0,506 $\pm$ 0.004 |
| 10 <sup>2</sup>                         | 404 $\pm$ 10.65                  | 6,36 $\pm$ 0.05  | 568 $\pm$ 3.48   | 134 $\pm$ 9.41   | 0,490 $\pm$ 0.009 |
| 10 <sup>3</sup>                         | 457 $\pm$ 23.04                  | 9,23 $\pm$ 2.07  | 662 $\pm$ 3.12   | 691 $\pm$ 66.38  | 0,740 $\pm$ 0.459 |
| 10 <sup>4</sup>                         | 557 $\pm$ 0.94                   | 7,96 $\pm$ 0.05  | 120 $\pm$ 2.05   | 541 $\pm$ 1.24   | 0,455 $\pm$ 0.002 |
| 10 <sup>5</sup>                         | 666 $\pm$ 2.35                   | 4,44 $\pm$ 0.02  | 189 $\pm$ 0.188  | 185 $\pm$ 1.41   | 0,372 $\pm$ 0.09  |

Fonte: próprio autor.

O biossensor demonstra respostas distintas de  $\Delta R_{ct}$ , *Candida tropicalis* > *Candida albicans* > *Candida glabrata*. Isso demonstra um comportamento linear. O biossensor apresentou diferentes respostas utilizando a ConA, sendo *Candida*

*tropicalis* apresentando a maior resposta, seguido por *Candida albicans* e, por fim, *Candida glabrata* com a menor resposta.

**Figura 26** - Relação entre a concentração das espécies de *Candidas spp* e o  $\Delta R_{ct}$  no sensor PPy-GQDs-ConA-BSA.



Fonte: Próprio autor.

A interação eficiente da ConA ocorre graças aos ligantes de açúcares presentes em sua superfície, que se ligam aos sítios de reconhecimento biológico nas espécies *Candida spp*. Dito isso, a *Candida spp* possui em sua composição presente na parede celular, alta proporção de carboidratos, como D-glicose (Glc), N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc), D-manose (Man) e ácido siálico (SA) destacam-se entre outros (cerca de 90%) e uma menor quantidade de proteínas (10%), desempenhando um papel fundamental nessa interação. A presença de polímeros de manose ligados a O-/N,  $\beta$ -glicanos e quitina na porção de carboidrato da parede celular contribui significativamente para essa capacidade de reconhecimento e interação com as células do hospedeiro (Gow et al., 2012; Dan et al., 2016).

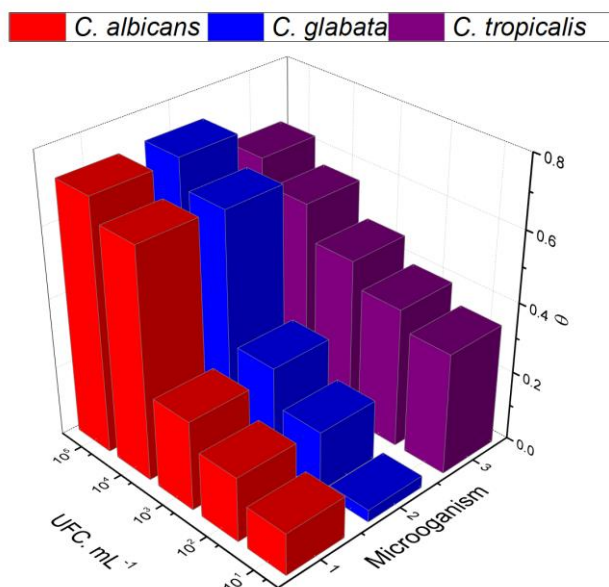
Para confirmar a eficácia da detecção biológica, usou-se o parâmetro  $\theta$  para avaliar o grau de cobertura superficial causado pelas espécies de *Candidas spp* na superfície do sistema PPy-GQDs-ConA, conforme detalhado no estudo de Sá et al., 2020. Como apresentada na equação 5.

$$\theta = 1 - \left( \frac{R_{\text{biosensor}}}{R_{\text{candida}}} \right) \quad \text{Eq. 5}$$

Nessa equação,  $\theta$  representa o grau de cobertura da superfície pelas espécies de *Candidas spp*;  $R_{\text{biosensor}}$  é a resistência à transferência de carga do eletrodo modificado.  $R_{\text{candida}}$  é a resistência à transferência de carga obtida em diferentes concentrações das espécies de *Candidas spp* na superfície do eletrodo modificado.

Esse valor de  $\theta$  ajuda a determinar o quanto a superfície do eletrodo foi coberta pelas cândidas, o que é fundamental para avaliar a eficiência da detecção biológica no sistema PPy-GQDs-ConA. Quanto maior o valor de  $\theta$ , maior é a cobertura da superfície do eletrodo pelas espécies de *Candida spp*, o que é relevante para a compreensão do desempenho do biossensor.

**Figura 27** - Grau de recobrimento do sistema sensor ( $\theta$ ) após exposição a espécies de *Cândida spp* ( $10^1$ - $10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup>).



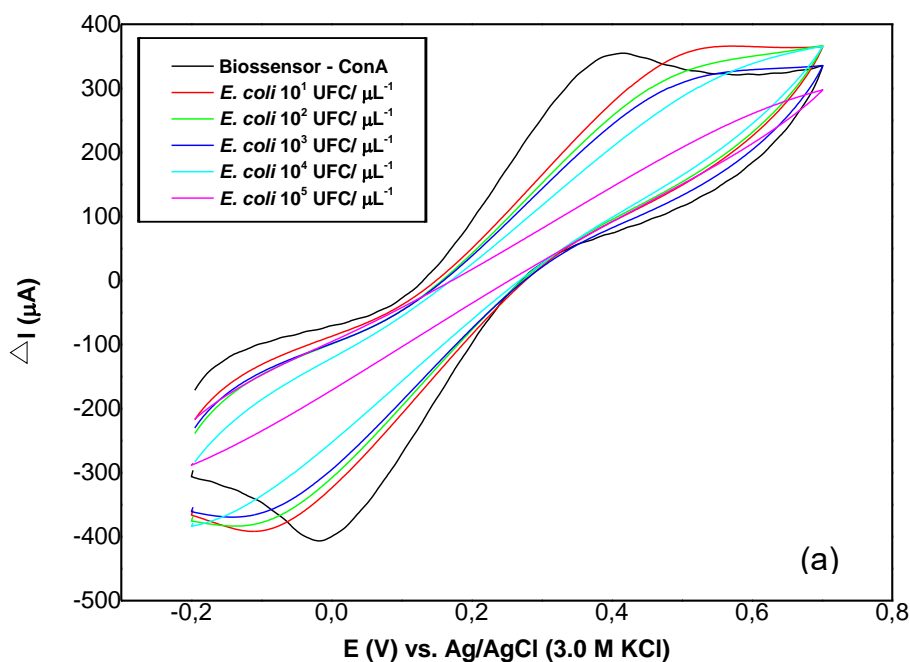
Fonte: Próprio autor.

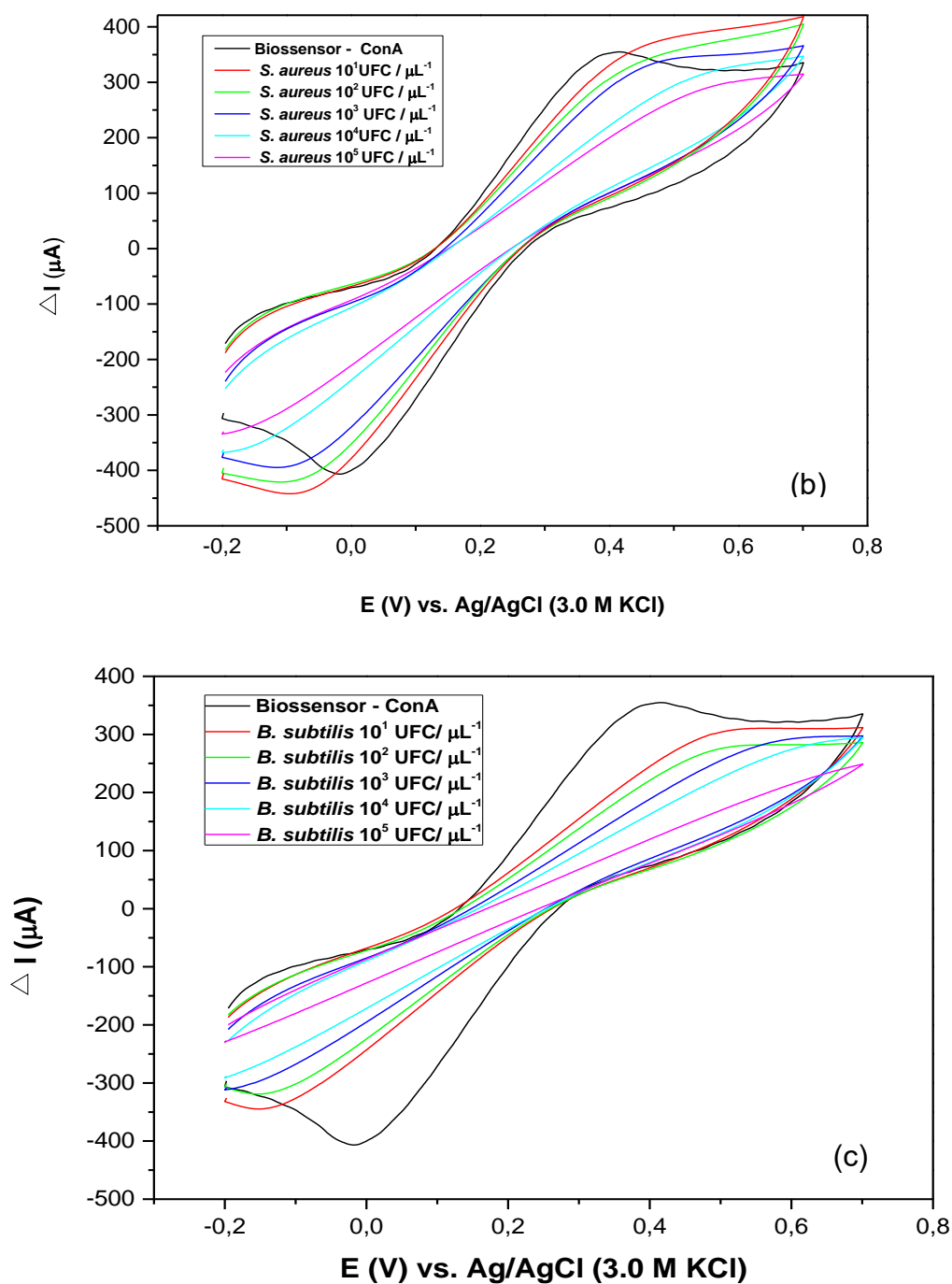
Os dados obtidos pelo  $\Delta RCT$  e  $\theta$  indicam que todas as amostras microbianas preencheram a camada de biorreconhecimento. Com base na Fig 27, fica evidente que os valores de  $\theta$  aumentam de acordo com a concentração microbiana avaliada, expressa em UFC/mL.

### 5.5 Caracterização eletroquímica da detecção de bactérias pelo biossensor PPy-GQDs-ConA-BSA

A Figura 28 e 29 (a-c) representa o VC e EIE respectivamente, do biossensor modificado com ConA para diferentes concentrações de bactérias com o limite de detecção entre  $10^1$  a  $10^5$  UFC mL<sup>-1</sup>, com sua respectiva resposta impedimétrica.

**Figura 28** - Voltamograma cíclico do sistema sensor, após o contato com as bactérias em diferentes concentrações: *E. coli* (a); *S. aureus* (b) e *B. subtilis* (c).





Fonte: próprio autor.

As respostas baseadas na técnica de voltametria das bactérias foi estudada, e entre elas, a *E. coli* (Fig. 27a) se destacou por apresentar uma menor atividade eletroquímica em relação às demais. Esse comportamento pode ser

atribuído à reduzida ligações de lectina-microrganismo em sua superfície, ou seja, uma menor ligação com carboidratos, como glicose, galactosamina, ramnose e entre outros, o que resulta em uma menor resistência à transferência de carga elétrica no sensor (Silva et al., 2021; Oliveira et al., 2011).

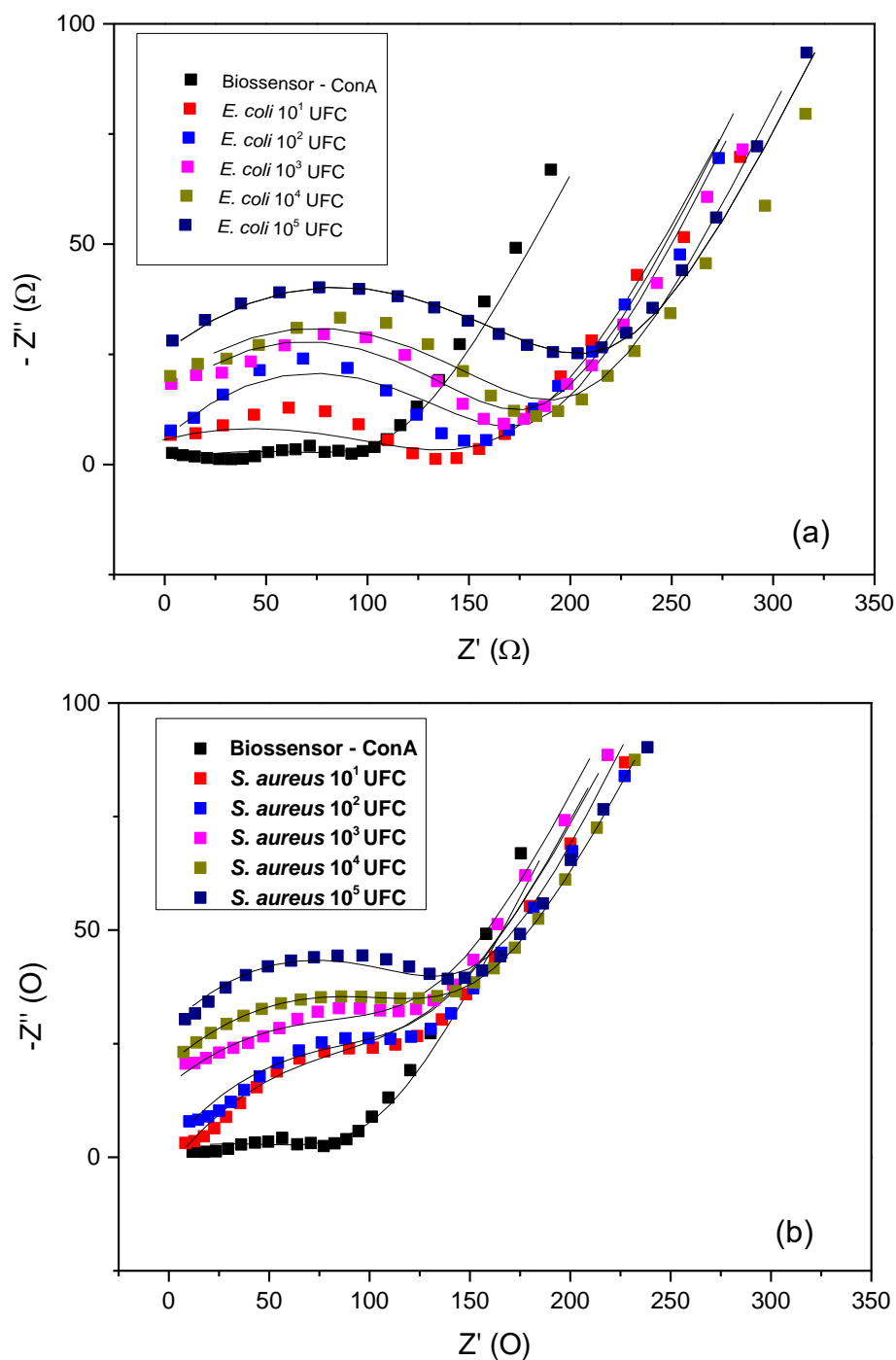
Na tabela 5 é possível evidenciar a corrente relativa ( $\Delta I$ ) da resposta do sistema sensor baseado em ConA frente as bactérias testadas e suas consecutivas concentrações. Desta forma, à medida que os valores de  $\Delta I$  aumentam, tanto os picos catódicos quanto os anódicos diminuem, devido ao processo de bioreconhecimento pela interação entre a lectina e a bactéria.

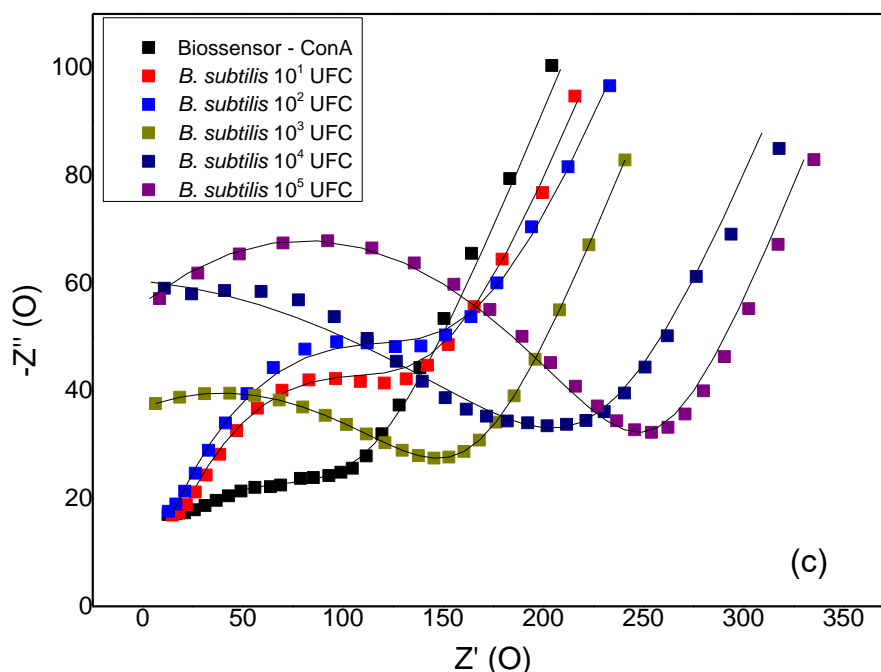
**Tabela 5** - Corrente relativa ( $\Delta I\%$ ) do biossensor após a interação com bactérias gram-positivas e negativas em diferentes concentrações ( $10^1$  a  $10^5$  UFC mL<sup>-1</sup>).

| Sistema                                   | Ipa( $\mu$ A)             | $\Delta I$ (%) |
|---|---------------------------|----------------|
| ITO-PPy-GQDs-ConA-BSA                     | 200.44 $\pm$ 1.91         | -              |
| <b>Concentração (UFC/mL<sup>-1</sup>)</b> | <b><i>E. coli</i></b>     |                |
| $10^1$                                    | 120.34 $\pm$ 1.41         | 39,95%         |
| $10^2$                                    | 72.68 $\pm$ 3.32          | 63,74%         |
| $10^3$                                    | 64.58 $\pm$ 3.24          | 67,77%         |
| $10^4$                                    | 56.08 $\pm$ 1.38          | 72,01%         |
| $10^5$                                    | 46.76 $\pm$ 3.80          | 76,67%         |
|   | <b><i>S. aureus</i></b>   |                |
| $10^1$                                    | 110.66 $\pm$ 1.09         | 44,79%         |
| $10^2$                                    | 84.81 $\pm$ 0.18          | 57,68%         |
| $10^3$                                    | 72.55 $\pm$ 1.39          | 63,80%         |
| $10^4$                                    | 68.61 $\pm$ 1.03          | 65,77%         |
| $10^5$                                    | 41.40 $\pm$ 3.06          | 79,34%         |
|   | <b><i>B. subtilis</i></b> |                |
| $10^1$                                    | 85.56 $\pm$ 3.48          | 57,31%         |
| $10^2$                                    | 74.95 $\pm$ 3.69          | 62,60%         |
| $10^3$                                    | 65.26 $\pm$ 2.51          | 67,43%         |
| $10^4$                                    | 52.43 $\pm$ 0.53          | 73,84%         |
| $10^5$                                    | 45.27 $\pm$ 2.79          | 77,41%         |

Fonte: Próprio autor.

**Figura 29** - Diagramas de Nyquist do sistema sensor, seguido pela resposta eletroquímica após entrar em contato com a *E. coli*(a), *S. aureus* (b) e *B.subtilis* (c) ( $10^1$  a  $10^5$  UFC mL<sup>-1</sup>).





Fonte: Proprio autor.

Em contraste, outras bactérias, como *S. aureus* (b) e *B. subtilis* (c) exibiram respostas impedimétricas mais robustas, indicando uma maior atividade eletroquímica devido à sua carga superficial mais acentuada, devido a ligação entre os carboidratos, como ácido lipoteicoico, N – acetilglicosamina e entre outros (Roux et al., 2015).

As bactérias avaliadas para os respectivos LODs e LQs foram de 2.63 e 1.29 UFC/mL para *E. coli* com regressão linear de  $y = 0.457 + 0.049 \text{ Log}(x)$  e  $R^2 = 0.94$ . Para *S. aureus* LOD = 0.39 UFC/mL e LQ = 0.14 UFC/mL com equação da reta  $y = 0.556 + 0.035 \text{ Log}(x)$  e  $R^2 = 0.99$ . O LOD de 0.72 UFC/mL e LQ de 0.145 UFC/mL para *B. subtilis* apresentou a equação linear de  $y = 0.645 + 0.018 \text{ Log}(x)$  e  $R^2 = 0.99$ .

Com o objetivo de possibilitar a avaliação quantitativa, análise dos dados experimentais de impedância, frequentemente recorre-se ao uso de modelos de circuitos equivalentes. Esses dados confirmam e comprovam a capacidade do biossensor proposto nessa pesquisa em realizar uma análise quantitativa das bactérias. Os resultados obtidos na Tabela 6 mostram que o  $R_{ct}$  também possui uma relação diretamente proporcional com a concentração da bactéria.

Com base nos resultados já mencionados, foi observado que a plataforma PPy-GQDs-ConA-BSA mantém a capacidade de identificar várias espécies de

bactérias em concentrações distintas. Assim, para avaliar a eficácia do biossensor na detecção das bactérias, é empregada a variação relativa do  $R_{ct}$  ( $\Delta R_{ct}$ ), como demonstrado na figura 30.

A Fig. 30 apresenta a influência das concentrações nas mudanças do  $\Delta R_{ct}$  diante os resultados pela interação do biossensor com diferentes concentrações de bactérias Gram negativas e positivas ( $10^1$  a  $10^5$  UFC mL<sup>-1</sup>).

**Tabela 6** - Valores dos elementos de circuito equivalente dos resultados de impedância elétrica.

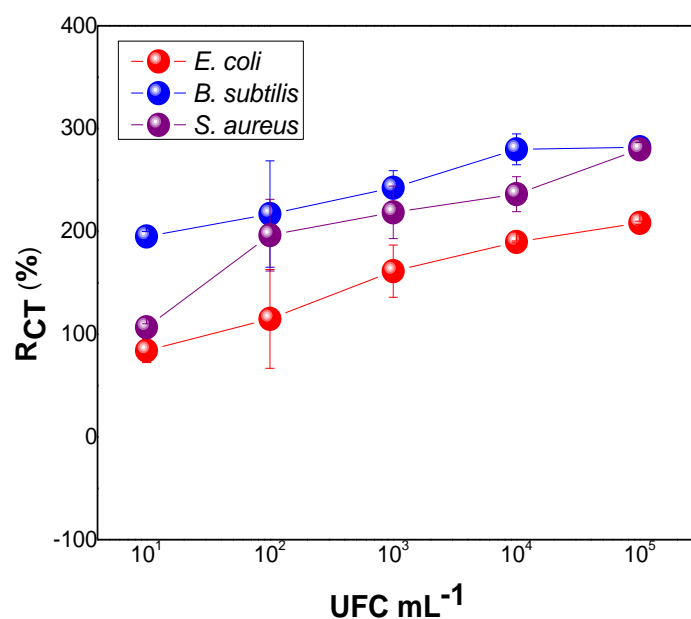
| Concentração<br>(UFC.mL <sup>-1</sup> ) | $R_{ct}$ (k $\Omega$ ) | W                            | Cdl ( $\mu$ F)  | $R_s$ ( $\Omega$ ) | N                 |
|---|------------------------|------------------------------|-----------------|--------------------|-------------------|
| ITO-PPy-<br>GQDs-ConA-<br>BSA           | 243 $\pm$ 5.71         | 9.19 $\pm$ 4.33              | 6.26 $\pm$ 0.2  | 285 $\pm$ 1.88     | 0.210 $\pm$ 0.15  |
|   |                        | <i>Escherichia coli</i>      |                 |                    |                   |
| $10^1$                                  | 463 $\pm$ 23.09        | 7,72 $\pm$ 0.02              | 134 $\pm$ 0.024 | 121 $\pm$ 1.24     | 0.587 $\pm$ 0.005 |
| $10^2$                                  | 558 $\pm$ 95.46        | 7,03 $\pm$ 0.04              | 165 $\pm$ 0.032 | 133 $\pm$ 1.24     | 0.571 $\pm$ 0.002 |
| $10^3$                                  | 616 $\pm$ 50.40        | 6,78 $\pm$ 0.008             | 182 $\pm$ 0.032 | 143 $\pm$ 0.81     | 0.560 $\pm$ 0.002 |
| $10^4$                                  | 704 $\pm$ 1.69         | 6,14 $\pm$ 0.008             | 144 $\pm$ 0.012 | 137 $\pm$ 0.81     | 0.574 $\pm$ 0.008 |
| $10^5$                                  | 749 $\pm$ 3.26         | 5,66 $\pm$ 0.008             | 160 $\pm$ 0.016 | 143 $\pm$ 0.47     | 0.564 $\pm$ 0.008 |
|   |                        | <i>Staphylococcus aureus</i> |                 |                    |                   |
| $10^1$                                  | 505 $\pm$ 6.94         | 9,14 $\pm$ 0.07              | 248 $\pm$ 10.87 | 637 $\pm$ 1.69     | 0.429 $\pm$ 0.004 |
| $10^2$                                  | 714 $\pm$ 69.11        | 7,81 $\pm$ 3.68              | 472 $\pm$ 58.17 | 647 $\pm$ 102.47   | 0.175 $\pm$ 0.008 |
| $10^3$                                  | 748 $\pm$ 50.63        | 9,67 $\pm$ 0.08              | 142 $\pm$ 5.88  | 679 $\pm$ 25.80    | 0.259 $\pm$ 0.013 |
| $10^4$                                  | 811 $\pm$ 33.74        | 9,55 $\pm$ 0.12              | 718 $\pm$ 3.66  | 755 $\pm$ 37.00    | 0.309 $\pm$ 0.015 |
| $10^5$                                  | 913 $\pm$ 13.19        | 10,3 $\pm$ 0.21              | 149 $\pm$ 0.09  | 609 $\pm$ 367.95   | 0.462 $\pm$ 0.002 |
|   |                        | <i>Bacillus subtilis</i>     |                 |                    |                   |
| $10^1$                                  | 723 $\pm$ 9.42         | 11,03 $\pm$ 0.04             | 174 $\pm$ 0.28  | 326 $\pm$ 2.05     | 0.341 $\pm$ 0.003 |
| $10^2$                                  | 762 $\pm$ 10.84        | 11,76 $\pm$ 0.18             | 763 $\pm$ 2.87  | 476 $\pm$ 0.81     | 0.419 $\pm$ 0.004 |
| $10^3$                                  | 808 $\pm$ 32.99        | 10,86 $\pm$ 0.16             | 771 $\pm$ 13.17 | 426 $\pm$ 4.49     | 0.269 $\pm$ 0.001 |
| $10^4$                                  | 916 $\pm$ 29.76        | 4,92 $\pm$ 0.04              | 959 $\pm$ 5.49  | 442 $\pm$ 28.96    | 0.651 $\pm$ 0.009 |
| $10^5$                                  | 925 $\pm$ 6.01         | 5,48 $\pm$ 0.01              | 906 $\pm$ 2.09  | 481 $\pm$ 5.71     | 643 $\pm$ 0.004   |

Fonte: próprio autor.

Nessa pesquisa, foi constatado que os resultados demonstraram um aumento contínuo nos valores de  $\Delta R_{ct}$  à medida que a concentração das bactérias aumentava. Isso sugere que a ConA tem a capacidade de identificar diferentes estruturas de carboidratos presentes na parede celular bacteriana (Silva et al., 2021).

A interação do biossensor frente as diluições das bactérias gram negativas e positivas exibem diferentes respostas de  $\Delta R_{ct}$ , sendo para bactérias gram-negativas e bactérias gram-positivas, respectivamente, *B. subtilis* > *S. aureus* > *E. coli*.

**Figura 30** -  $\Delta R_{ct}$  do sensor PPy-GQDs-ConA-BSA após ser submetido a diferentes concentrações bacterianas.



Fonte: Próprio autor.

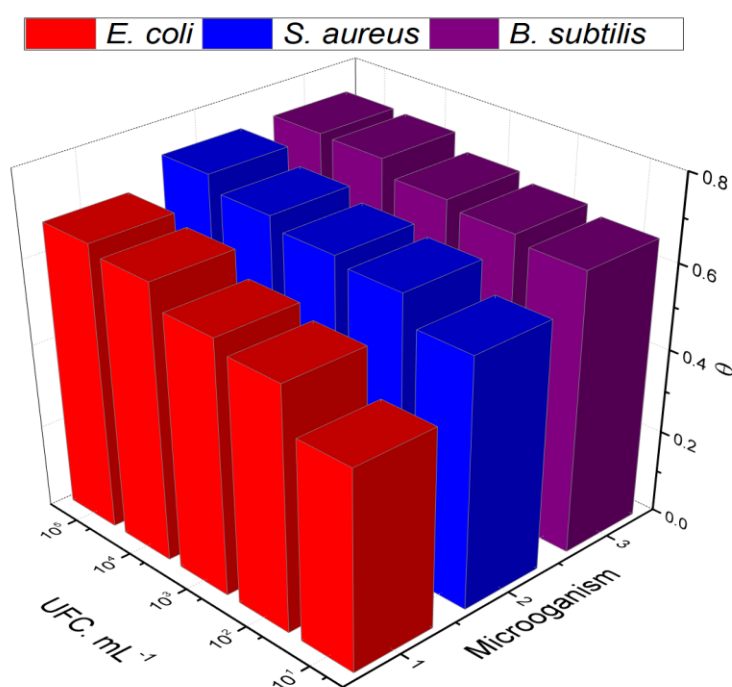
Com isso, esses resultados revelam uma conexão direta entre os valores de  $\Delta R_{CT}$  e as concentrações bacterianas distintas, sugerindo que essa plataforma pode ser aplicada como um biossensor quantitativo. Como apresentado na figura 19c, após a imobilização da ConA, as imagens de AFM da plataforma PPy-GQDs exibem aglomerados espessos, sendo esses resultados associados ao tamanho e à distribuição física da ConA nos transdutores.

Para confirmar a eficácia da detecção biológica, usou-se o parâmetro  $\theta$  para avaliar o grau de cobertura superficial causado pelas bactérias na superfície do sistema PPy-GQDs-ConA, conforme detalhado no estudo de Silva et al., 2020. Como apresentada na equação.

Esse valor de  $\theta$  ajuda a determinar o quanto a superfície do eletrodo foi coberta pelas bactérias, o que é fundamental para avaliar a eficiência da detecção biológica no sistema PPy-GQDs-ConA. Quanto maior o valor de  $\theta$ , maior é a cobertura da superfície pelas bactérias o que é relevante para a compreensão do desempenho do biossensor.

Com base na Figura 31, fica evidente que os valores de  $\theta$  aumentam de acordo com a concentração bacteriana avaliada, expressa em UFC/mL. Isso sugere que à medida que a quantidade de microrganismos aumenta, a cobertura da camada de biorreconhecimento também aumenta.

**Figura 31** - Grau de recobrimento do sistema sensor ( $\theta$ ) após exposição as bactérias gram +/- em diferentes concentrações ( $10^1$ - $10^5$  UFC mL<sup>-1</sup>).



Fonte: Próprio autor.

O biossensor PPy-GQDs-ConA mostra uma boa capacidade de detecção quando comparado com outras plataformas biossensoras que utilizam ConA como elemento de biodetecção, conforme indicado na Tabela 7. Isso se traduz em uma capacidade mais ampla de detectar diversos microrganismos em comparação com essas outras plataformas.

**Tabela 7** - Plataformas biossensoras que consistem na utilização da lectina ConA, seus microrganismos alvo e os limites de detecção correspondentes.

| Plataforma                  | Componente biológico | Limite de detecção (UFC mL <sup>-1</sup> ) | Analito   | Técnica                      | Referências             |
|-----------------------------|----------------------|--|---|------------------------------|-------------------------|
| Nanocristais                | Lectina Cramoll      | 10 <sup>6</sup> UFC mL <sup>-1</sup>       | <i>C. albicans</i>  | Microscopia de fluorescência | (Cunha et al., 2017)    |
| Eletrodo de ouro            | Lectina ConA e WGA   | 10 <sup>2</sup> UFC mL <sup>-1</sup>       | <i>C. albicans</i> ,<br><i>C. tropicalis</i> ,<br><i>C. krusei</i> ,<br><i>C. parapsilosis</i>                                  | EIE                          | (Sá et al., 2020)       |
| Nanopartículas de quitosana | Lectina WGA          | 10 <sup>5</sup> UFC mL <sup>-1</sup>       | <i>C. albicans</i>  | Microscópica de Aglutinação  | (Punjabi et al., 2022)  |
| Eletrodo de ouro            | Lectina ConA e WGA   | 10 <sup>1</sup> UFC mL <sup>-1</sup>       | <i>K. pneumonia</i> e, <i>B. subtilis</i> , <i>E. faecalis</i>  | EIE e VC                     | (Silva et al., 2021)    |
| Eletrodo de ouro            | Lectina CramoLL      | 200eug mL                                  | <i>K. pneumonia</i> e, <i>S. entérica</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. marcescens</i>   | EIE e VC                     | (Oliveira et al., 2011) |
| Nanopartículas de quitosana | Lectina WGA          | 10 <sup>5</sup> UFC mL <sup>-1</sup>       | <i>S. aureus</i> ,<br><i>E. coli</i>  | Microscopia de Aglutinação   | (Punjabi et al., 2022)  |
| Eletrodo em ITO             | Lectina ConA         | 10 <sup>1</sup> UFC mL <sup>-1</sup>       | <i>C. albicans</i> ,<br><i>C. glabata</i> ,<br><i>C. tropicalis</i> ;<br><i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i> | EIE e VC                     | Este trabalho           |

Fonte: Próprio autor.

Na Tabela 7, são apresentados biossensores baseados na lectina ConA, seus microrganismos-alvo e os respectivos limites de detecção. O estudo

conduzido por Cunha et al. (2017) demonstrou a utilização de nanocristais como molécula de biodeteção para a lectina Cramoll, empregando Microscopia de Fluorescência. Este método alcançou um limite de detecção de  $10^6$  UFC/mL para *Candida albicans* (Cunha et al., 2017).

Outra plataforma utilizou um eletrodo de ouro combinado com as lectinas ConA e WGA, alcançando um limite de detecção de  $10^2$  UFC/mL para *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*, por meio da técnica de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE) (Sá et al., 2020). Adicionalmente, nanopartículas de quitosana, contendo a lectina WGA, demonstraram um limite de detecção de  $10^5$  UFC/mL para *C. albicans*, utilizando Microscopia de Aglutinação (Punjabi et al., 2022).

Outro estudo visando a detecção de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas empregou um eletrodo de ouro com as lectinas ConA e WGA como moléculas de biodeteção, alcançando um limite de detecção de  $10^1$  UFC/mL para microrganismos como *K. pneumoniae*, *B. subtilis* e *E. faecalis*, utilizando Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE) e Voltametria Cíclica (VC) (Silva et al., 2021).

Além disso, a utilização de um eletrodo de ouro com lectina CramoLL revelou uma sensibilidade de 200 eug/mL para *K. pneumoniae*, *S. entérica*, *E. coli* e *S. marcescens*, através Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE) e Voltametria Cíclica (VC) (Oliveira et al., 2011). Por fim, nanopartículas de quitosana contendo lectina WGA demonstraram um limite de detecção de  $10^5$  UFC/mL para microrganismos como *S. aureus* e *E. coli*, utilizando microscopia de aglutinação (Punjabi et al., 2022).

Este trabalho empregou um eletrodo de óxido de estanho dopado com índio (ITO) como plataforma sensorial para a detecção de microrganismos patogênicos, incluindo *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *E. coli*, *S. aureus* e *B. subtilis*. As técnicas utilizadas foram voltametria cíclica e eletroquimioluminescência imunoenzimática, permitindo a identificação sensível desses microrganismos. O estudo alcançou um notável limite de detecção de  $10^1$  UFC/mL, destacando a eficácia do eletrodo ITO combinado com essas técnicas para diagnóstico rápido e sensível de infecções bacterianas e fúngicas.

Os biossensores têm sido desenvolvidos para detectar bactérias, aproveitando as interações entre lectinas e glicoconjugados presentes na superfície celular bacteriana. A escolha das lectinas para essa função é justificada pela sua facilidade de produção e estabilidade natural (YANG et al., 2016). Na detecção de bactérias, a lectina ConA interage principalmente com resíduos de glicose e manose nos lipopolissacarídeos (LPS) de espécies gram-negativas, bem como o peptidoglicano e os ácidos teicóicos de espécies gram-positivas (MI et al., 2021). Conforme relatado por Yang e seus colegas, os lipopolissacarídeos são os principais sítios de interação para bactérias gram-negativas com a lectina ConA. Isso se deve à semelhança na densidade e construção das paredes celulares entre as diferentes espécies bacterianas, incluindo as gram-positivas (YANG et al., 2016; Silva et al., 2021).

A parede celular bacteriana, predominantemente constituída de peptidoglicano, forma a estrutura protetora das bactérias. Essa parede varia em espessura e arquitetura, levando à classificação em dois grupos principais: Gram-negativas e Gram-positivas. Nas Gram-negativas, uma camada externa de LPS, composta por lipídeo A e antígeno O, contendo N-acetilglucosamina-N-acetilglucosamina, uma porção de dissacarídeo. Essas variações exibem estruturas que desencadeiam respostas imunológicas específicas. Em contraste, as Gram-positivas apresentam uma camada mais espessa de peptidoglicano (até 30 nm em comparação aos 10 nm das bactérias gram negativas) e um equivalente ao LPS chamado ácido lipoteicóico (LTA). Nesse contexto, a ConA é explorada devido à sua capacidade de se ligar a carboidratos, sendo utilizada para interagir com sacarídeos e glicoconjugados na superfície das células bacterianas (Ahmed et al., 2014; Heindel et al., 2022).

Além disso, as bactérias podem modular o glicoma do hospedeiro através da regulação enzimática. Elas têm a capacidade de influenciar a expressão de enzimas do hospedeiro envolvidas na síntese e degradação de glicanos. Essa modulação enzimática pode resultar em alterações na estrutura e na disponibilidade de açúcares específicos no ambiente celular, impactando a interação entre as bactérias e o hospedeiro, incluindo processos como adesão bacteriana, resposta imunológica e adaptação ao ambiente hospedeiro (Sjögren J e Collin M., 2014).

Desta forma, os resultados indicam que as bactérias aderem a camada do biossensor utilizando a ConA, formando complexos lectina-bactéria que atuam como barreiras físicas ao par redox, dificultando sua chegada à superfície do eletrodo e aumentando assim a resistência a transferência de carga. A resposta varia com o número de células imobilizadas, dependendo de sua combinação específica de sacarídeos de membrana e da interação com a ConA (He et al., 2016; Lee et al., 2018).

As espécies de *Candidas spp* também são empregadas para detecção em biossensores, diante os diferentes padrões de reconhecimento das lectinas que podem ser atribuídos aos vários açúcares presentes em sua superfície. A análise estrutural de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* revelou a presença de resíduos de manose ligados a 1,2 fosfodiesterificados. Dito isso, é importante destacar a presença desses resíduos de manose fosfodiesterificada que desempenha um papel crucial na interação das lectinas, resultando em um aumento na resposta de aglutinação (Nguyen et al., 2018; Kubota et al., 2017).

Contudo, a ConA demonstrou ser uma alternativa de proteína para o biorreconhecimento de espécies de *Candidas spp* e bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, graças às suas características de biorreconhecimento e habilidade de se ligar aos carboidratos presente em sítios de reconhecimento biológico de múltiplas espécies de microrganismos.

## 6 Conclusão

- Desenvolvimento do biossensor eletroquímico com base em Ppy, GQDs e ConA para análises rápidas, sensível e seletiva na detecção de microrganismos patogênicos devido à ligação a carboidratos como glicose e manose;
- Análise microscópica por AFM evidenciou a formação de uma camada densa durante o bioreconhecimento, atribuída ao complexo lectina-microrganismo. O acompanhamento por FTIR revelou que após a imobilização da ConA, os sinais do PPy e GQDs permaneceram, mantendo suas estruturas e funcionalidades;
- Técnicas eletroquímicas voltamétricas e impedimétricas confirmaram a imobilização adequada das camadas na plataforma nanoestruturada;
- Sensibilidade e seletividade do biossensor ConA em relação a *Candida* spp e bactérias Gram-negativas e positivas, com destaque para *Candida tropicalis* e *Bacillus subtilis*. Em suma, o biossensor obteve o limite de detecção de 101 UFC/mL para todos os microrganismos avaliados;
- O biossensor é uma alternativa promissora para a identificação de microrganismos de interesse clínico, com rápida capacidade de detecção, prevenindo a disseminação de infecções;
- Aplicabilidade do biossensor em análises ambientais, contribuindo para a monitoração de microrganismos patogênicos em diferentes cenários;
- Essa versatilidade e precisão têm o potencial de contribuir significativamente para a segurança e a prevenção de doenças tanto em ambientes clínicos como em outros contextos.

## 7 Perspectivas

Embora as respostas de construção do biossensor baseado em PPy-GQDs-ConA-BSA utilizando técnicas eletroquímicas tenham sido promissoras, serão necessários estudos complementares, com o objetivo para futuras pesquisas, tendo em vista outros microrganismos, como outras bactérias gram negativas e positivas e espécies de *Candidas spp*, bem como vírus e protozoários, que são igualmente comuns em casos de infecção hospitalar. O próximo passo seria a realização de testes em amostras reais de pacientes para alcançar uma sensibilidade efetiva e compará-la com o teste padrão. Além disso, a possibilidade de miniaturização do sensor, visando aprimorar sua aplicação prática. Com tudo, os biossensores eletroquímicos apresentam perspectivas promissoras para o desenvolvimento de protótipos. No entanto, o tempo de armazenamento e capacidade de reutilização demandam testes futuros para um aprimoramento mais efetivo.

## 8 Referências

- AHMED, A. *et al.* Biosensors for whole-cell bacterial detection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 3, p. 631–646, 2014.
- AJJAN, F. *et al.* Spectroelectrochemical investigation of redox states in a polypyrrole/lignin composite electrode material. **Journal of Materials Chemistry**, v. 3, n. 24, p. 12927-12937, 2015.
- ALVES, C. C.; COELHO, M. K. L.; PEREIRA, A. C. Electrochemical Sensors Based on Different Materials for the Determination of Pesticides. **Revista Virtual de Química**, v. 12, n. 6, p. 1.599-1.625, 2020.
- ALVES, I. A.; CAMARGO, F. P.; GOULART, L. S. Identificação por PCR e sensibilidade a antifúngicos de isolados clínicos vaginais de *Candida* sp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 5 pp. 575-579, 2020.
- ANDRADE, C. A. S. *et al.* Nanostructured sensor based on carbon nanotubes and clavanin A for bacterial detection. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 1, n. 135, p. 833-839, 2015.
- ARAÚJO, P. L. *et al.* Prevalencia de la infección relacionada con la asistencia a la salud en pacientes hospitalizados en unidad de cuidados intensivos. **Enfermería Global**, v. 17, n. 52, p. 278-315, 2018.
- ARDUINI, F. *et al.* Electrochemical biosensors based on nanomodified screen-printed electrodes: Recent applications in clinical analysis, **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 79, p. 114-126, 2016.
- ATES, M. A review study of (bio) sensor systems based on conducting polymers. **Materials Science and Engineering: C**, v. 33, n. 4, p. 1853-1859, 2013.
- ATTA, N. F.; GALAL, A.; EL-ADS, E. H. A novel sensor of cysteine self-assembled monolayers over gold nanoparticles for the selective determination of epinephrine in presence of sodium dodecyl sulfate. **The Analyst**, v. 137, n. 11, p. 2658–68, 2012.
- AVELINO, K. Y. P. S. *et al.* Nanostructured sensor platform based on organic polymer conjugated to metallic nanoparticle for the impedimetric detection of SARS-CoV-2 at various stages of viral infection. **Pharm Biomed Anal.**, v. 206, 2021.
- AVELINO, K. Y. P. S. *et al.* Flexible sensor based on conducting polymer and gold nanoparticles for electrochemical screening of HPV families in cervical specimens, **Talanta**, v. 226, 2021.
- BADIEEL, P. *et al.* Antifungal susceptibility patterns of colonized *Candida* species isolates from immunocompromised pediatric patients in five university hospitals. **Iran. J. Microbiol.**, v. 9, n. 6, p. 363-371, 2017.

BARAC, A. *et al.* Investigation of a healthcare-associated *Candida tropicalis* candidiasis cluster in a haematology unit and a systematic review of nosocomial outbreaks. **Mycoses**, v. 63, n. 4, p. 326-333, 2020.

BARD, A. J. *et al.* Fundamentals and applications. **Electrochemical methods**, v. 2, n. 482, p. 580-632, 2001.

BARRE, A. *et al.* Visão geral das relações estrutura-função de lectinas específicas de manose de plantas, algas e fungos. **Int. J. Mol. Ciência**, v. 20, n. 2, 2019.

BASIC overview of the working principle of a potentiostat/galvanostat (PGSTAT) – Electrochemical cell setup. **Metrohm Autolab.B.V**, 2011.

BAZIN, I. *et al.* Marty JL. New biorecognition molecules in biosensors for the detection of toxins. **Biosens Bioelectron**, v. 15, n. 87, p. 285-298, 2017.

BILIR, S. P. *et al.* O impacto econômico da rápida identificação de espécies de *Candida* por T2Candida entre pacientes de alto risco. **Future Microbiol.**, v. 10, p. 1133–1144, 2015.

BINNIG, G.; QUATE, C. F.; GERBER, CH. Atomic Force Microscope. **Phys. Rev. Lett.**, v. 56, 1986.

BONA, E. *et al.* Sensitivity of *Candida albicans* to essential oils: are they an alternative to antifungal agents? **Journal of Applied Microbiology**. v. 121, n. 6, p. 1530-1545, 2016.

BRAIN, S.; NARINESINGH, D.; GUISEPPI-ELIE, A. Polypyrrole-hydrogel composites for the construction of clinically important biosensors, **Biosensors and Bioelectronics**, v. 17, n. 1, p. 53-59, 2002.

BRASIL. Agência Brasileira de Vigilância Sanitária. **Prevenção de infecções por microrganismos multirresistentes em serviços de saúde. Boletim Informativo**, v. 1. Brasília: DF, 2021.

BRASIL. Agência nacional de vigilância sanitária. **Boletim segurança do paciente e qualidade em Serviços de Saúde nº17**: Avaliação dos indicadores de IRAS e Resistência microbiana. Brasília, DF, 2017.

BUENO, P. R. Espectroscopia de Impedância Eletroquímica Aplicada ao Estudo das Reações Heterogêneas em Ânodos Dimensionalmente. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 796-804, 2006.

CALFEE, D. P. *et al.* Strategies to Prevent Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Transmission and Infection in Acute Care Hospitals: 2014 Update. **Infection control and hospital epidemiology**, v. 35, n. 7, p. 772–96, 2014.

CARDOSO, C. M. **Candidemia por Candida glabrata**: Revisão de Literatura. 2019. 40 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em microbiologia clínica) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2019.

CARIOCA, G. **Perfil epidemiológico de infecções relacionadas à assistência à saúde na UTI geral de um hospital filantrópico brasileiro**. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Farmácia) – Faculdade Guairacá, Guarapuava, 2019.

CAROFF, M.; KARIBIAN, D. Structure of bacterial lipopolysaccharides. **Carbohydrate Research**, v. 338, n. 23, p. 2431–2447, 2003.

CARVALHO, L. A.; ANDRADE, A. R.; BUENO, P. R. Electrochemical impedance spectroscopy applied in the study of heterogeneous. *Revista Química Nova*, v. 29, n. 4, 2006.

CAVADA, B. S. *et al.* One century of ConA and 40 years of ConBr research: A structural review. **Int J Biol Macromol.**, v. 10, n. 4, p.901-911, 2019.

CHANG, B. Y.; PARK, S. M. Electrochemical impedance spectroscopy. **Annual review of analytical chemistry**, v. 3, p. 207–229, 2010.

CHÁVEZ, T. *et al.* Incidência e fatores de risco para bacteremia em pacientes pediátricos com queimaduras em um Centro de Atendimento Especializado no México. **Rev. Chilena Infectol.**, v. 34, n. 3, p. 221–226, 2017.

CHOI, W. *et al.* Modeling and applications of electrochemical impedance spectroscopy (Eis) for lithium-ion batteries. **Journal of Electrochemical Science and Technology**, v. 11, n. 1, p. 1–13, 2020.

CINCOTTO, F.H. *et al.* A new disposable microfluidic electrochemical paper-based device for the simultaneous determination of clinical biomarkers. **Talanta**, v. 195, n. 62, 2019.

CLARK, L. C.; LYONS, C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. **Annals Of The New York Academy Of Sciences**, v. 102, n. 1, p. 29–45, 1962.

COELHO, L. *et al.* Lectinas, interligando proteínas com aplicações biotecnológicas/farmacológicas e terapêuticas. **Complemento Alternativo Baseado em Evidências Médicas**, 2017.

COELHO, M. K. L.; GIAROLA, J. F.; PEREIRA, A. C. Electrochemical sensors based on polymers printed molecularly and the determination of drugs in pharmaceutical and biological samples. **Revista Virtual de Química**, v. 10, n. 5, p. 1.180-1.206, 2018.

CORREIA, S. E. G. **Estudos de interação entre lectinas do tipo ConA e glicanos presentes na proteína Spike do novo Coronavírus**. 2022. 50f.

Dissertação (mestrado em Biotecnologia de Recursos Naturais) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Fortaleza, 2022.

COSTA, A. L. P.; SILVA JUNIOR, A. C. S. Resistência bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública: uma breve revisão de literatura. **Estação Científica (UNIFAP)**, v. 7, n. 2, p. 45, 2017.

COSTA, M. B. G. *et al.* Synthesis and characterization of conducting polypyrrole/SBA-3 and polypyrrole/Na–AISBA-3 composites. **Materials Research Bulletin**, v. 48, n. 2, p. 661-667, 2013.

COSTA, M. B. G. *et al.* Synthesis and characterization of conducting polypyrrole/SBA-3 and polypyrrole/Na–AISBA-3 composites. **Materials Research Bulletin**, v. 48, n. 2, p. 661-667, 2013.

COSTA, L. A. **Biossensor impedimétrico baseado em nanopartículas de CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> acopladas a concanavalina a para detecção de E. coli.** 2022.

Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2022.

CUSTÓDIO, M. E. **Sínteses químicas para obtenção e caracterização do polipirrol e nanofibras.** 2023. 53 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Itajubá, Itajubá, 2023.

DAI, H., ZHANG, S., HONG, Z., & LIN, Y. A potentiometric addressable Photoelectrochemical biosensor for sensitive detection of two biomarkers. **Analytical chemistry**, v. 88, n. 19, p. 9532-9538, 2019.

DAI, Z.; KAWDE, A. N.; XIANG, Y.; LA BELLE, J. T.; GERLACH, J.; BHAVANANDAN, V. P.; JOSHI, L.; WANG, J. Nanoparticle-based sensing of glycan-lectin interactions. **J Am Chem Soc.**, v. 128, n. 31, p. 10018-10019, 2006.

DAINIYAK, M. B.; GALAEV, I. Y.; MATTIASSON, B. O. Monólitos de criogel de afinidade para triagem de condições ideais de separação e separação cromatográfica de células. **Revista de Cromatografia A.**, v. 2, p. 145-150, 2006.

DAINIYAK, M. B.; GALAEV, I.Y.; MATTIASSON, B. **Affinity cryogel monoliths for screening for optimal separation conditions and chromatographic separation of cells.** 2006.

Dakshayini, K. R. *et al.* A imunidade e a patologia antifúngica humana Th17 dependem da reatividade cruzada contra Candida albicans. **Célula**, v. 176, n. 6, p. 1340–1355, 2011.

DAMOS, F. S.; MENDES, R. K.; KUBOTA, L. T. Aplicações de QCM, EIS e SPR na investigação de superfícies e interfaces para o desenvolvimento de (bio)sensores. **Revista Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 970-979, 2004.

DAN, X.; LIU, W.; NG, T. B. Desenvolvimento e aplicações de lectinas como ferramentas biológicas em pesquisa biomédica. **Med. Res. Rev.**, v. 36, p. 221–247, 2016.

DARVISHI, M.; FOROOTAN, M.; NAZER, M. R.; KARIMI, E.; NOORI, M. Nosocomial infections, challenges and threats. **A Review Article. Iran J Med Microbiol**, v. 14, n. 2, p. 162-181, 2020.

DE MELO-DIOGO, D. *et al.* Functionalization of graphene family nanomaterials for application in cancer therapy. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, n. 171, p. 260-275, 2018.

DE MIRANDA, J. L. *et al.* A simple nanostructured biosensor based on clavanin A antimicrobial peptide for gram-negative bacteria detection. **Biochemical Engineering Journal**, v. 124, p. 108–114, 2017.

DINIZ NINS, C. **Principais Mecanismos de Resistência de Candida albicans e de Espécies de Candidas Não Albicans**: Uma Revisão Bibliográfica. 2023. 50 f. Monografia (Graduação em Farmácia) - Universidade Federal de Ouro Preto, Escola de Farmácia, Ouro Preto, 2023.

DOI, A. M. *et al.* Epidemiology and microbiologic characterization of nosocomial candidemia from a Brazilian national surveillance program. **PloS one**, v. 11, n. 1, 2016.

DORON, I.; LEONARDI, I. *et al.* A micobiota intestinal humana ajusta a imunidade por meio da indução de anticorpos IgG antifúngicos dependentes de CARD9. **Célula**, v.184, n. 4, p. 1017–1031, 2021.

DOUDA, J. *et al.* Optical properties of amine-functionalized graphene oxide. **Applied Nanoscience**, v. 9, n. 4, p. 567-578, 2019.

DUARTE, E. R. **Microbiologia Básica para Ciências Agrárias**. Montes Claros: Instituto de Ciências Agrárias da UFMG, 2011.

DUCEL, G.; FABRY, J.; NICOLLE, L. Prevention of hospital-acquired infections. **World Health Organization**, p. 1–64, 2002.

DUO Filho, V. B.; SIQUEIRA, J. P. Z.; COLOMBO, T. E. Monitoramento de fungos anemófilos no ambiente de uma biblioteca no município de São José Do Rio Preto - SP, Brasil. **Arquivos De Ciências Da Saúde Da UNIPAR**, v. 24, n. 2, 2020.

EATON, P.; WEST, P. **Atomic Force Microscopy**. Oxford University Press, 2010.

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

ESPOSITO, S.; SIMONE, G. Update on the main MDR pathogens: Prevalence and treatment options. **Infezioni in Medicina**, v. 25, n. 4, p. 301–310, 2017.

FELIX, D. M. **Ponto quântico de grafeno (Graphene quantum dot) decorado com imatinibe para o tratamento da leucemia**. 2020. 64 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2020.

FOHONA, S. COULIBALY, B.; YOUAN, C. Concanavalin A–Polysaccharides binding affinity analysis using a quartz crystal microbalance. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 59, p. 404-411, 2014.

for biosensing. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 391, p. 1555-1567, 2008.

FORTO, C.; MICHALON, C. M. **Prevalência de infecções por bactérias resistentes a antimicrobianos em pacientes com COVID-19: revisão narrativa**. 2021. 35 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2021.

FRANCO, L.; OLIVEIRA, M. D. L. Sensor nanoestruturado baseado em nanotubos de carbono e clavanina A para detecção bacteriana. **Colloids Surf. B Biointerfaces**, v. 135, p. 833–839, 2015.

FREITAS, F.; MACHADO, J. Resistência aos Antibióticos – Uma ameaça crescente a nível europeu. **Bioanálise**, v. 1, p. 6–7, 2012.

FU, J. *et al.* Covalent Functionalization of Graphene Oxide with a Presynthesized Metal-Organic Framework Enables a Highly Stable Electrochemical Sensing. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 11, n. 36, p. 33238-33244, 2019.

GAGLIARDI, S. *et al.* Laser-Assisted Fabrication of Biomolecular Sensing Microarrays. **IEEE Transactions on NanoBioscience**, v. 6, n. 3, p. 242-248, 2007.

GAN, T.; SHENGSHUI, H. U. Electrochemical sensors based on graphene materials. **Microchimica Acta**, v. 175, p. 1-19, 2011.

GAUTAM, A. K. *et al.* Legume lectins: Potential use as a diagnostics and therapeutics against the cancer. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 142, p. 474–483, 2020.

GIONO-CEREZO, S. *et al.* Resistencia antimicrobiana. Importancia y esfuerzos por contenerla. **Gaceta de México**, v. 156, n. 2, p. 172–180, 2020.

GIRONES, R. *et al.* Molecular detection of pathogens in water – The pros and cons of molecular techniques. **Water Research**, v. 44, n. 15, p. 4325-4339, 2010.

GLOBAL report on infection prevention and control. **World Health Organization**, 2022 Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/354489>. Acesso em 10 fev. 2024.

Godoy, H. A. **Contributions to the Detection of Bacteria in Hospital Environments Using Electrochemical Immunosensors**. 2021. 79f. Dissertação (mestrado em) - Universidade Estadual de Campinas, Limeira, 2021.

GONG, J. *et al.* Genetic Differentiation, Diversity, and Drug Susceptibility of *Candida krusei*. *Frontiers in microbiology*, v. 9, n. 2717, 2018.

GORTHI, L. V. Morphological Classification of Fungal Infections (Yeasts, Mold, Dimorphic). In: TURGUT, M., CHALLA, S., AKHADDAR, A. (eds). **Fungal Infections of the Central Nervous System** Springer, Cham: Elsevier, 2019. p. 23-30.

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

GUERRA, B. S. **Desenvolvimento de biossensor eletroquímico baseado em nanopartículas de óxido de zinco para imunodeteção de aflatoxina B1 em alimentos**. 2021. 85 f. Dissertação (Mestrado em Inovação Terapêutica ) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2021.

GUEVARA AGUDELO, F. A. *et al.* Innovaciones en la terapia antimicrobiana. **Nova**, v. 18, n. 34, p. 9-25, 2020.

GURUNATHAN, S. *et al.* Differential Immunomodulatory Effect of Graphene Oxide and Vanillin-Functionalized Graphene Oxide Nanoparticles in Human Acute Monocytic Leukemia Cell Line (THP-1). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 2, p. 247, 2019.

GVOZDENOVIC, M. M. *et al.* Electrochemical synthesis of electroconducting polymers. **Hemijaska Industrija**, v. 68, n. 6, p. 673-684, 2014.

HAO, L. *et al.* Electrochemical lectin-based biosensor array for detection and discrimination of carcinoembryonic antigen using dual amplification of gold nanoparticles and horseradish peroxidase. **Sensors and Actuators B**, v. 235, p. 575–582, 2016.

HARTMANN, J.; VOIGT, P.; REICHLING, M. Measuring local thermal conductivity in polycrystalline diamond with a high resolution photothermal microscope. **J. Appl. Phys.**, v. 81, n. 7, p. 2966–2972, 1987.

HE, C. *et al.* A Highly Sensitive Glucose Biosensor Based on Gold Nanoparticles/Bovine Serum Albumin/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Biocomposite Nanoparticles. **Electrochimica Acta**, v. 222, p. 1709–1715, 2016.

HEINDEL, D. W. Glycomic Analysis Reveals a Conserved Response to Bacterial Sepsis Induced by Different Bacterial Pathogens. **ACS Infect.**, v. 8, n. 5, p. 1075–1085, 2022.

HELENA, M.; FIGUEIREDO, G.; CARVALHO, D. **Características fenotípicas associadas à virulência e ao perfil de suscetibilidade aos antifúngicos em isolados clínicos do complexo *Candida glabrata***. 2017. 168 f. Tese (Doutorado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas) – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2017.

HERGET, S. *et al.* Statistical analysis of the bacterial carbohydrate structure data base (BCSDB): Characteristics and diversity of bacterial carbohydrates in comparison with mammalian glycans. **BMC Structural Biology**, v. 8, n. 35, 2008.

Hespanhol, L. A. B. *et al.* Infecção relacionada à Assistência à Saúde em Unidade de Terapia Intensiva Adulto. **Enfermería Global**, v. 18, n. 1, p. 215-254, 2018.

HONG, Y. *et al.* Overview of Computational Simulations in Quantum Dots. **Israel Journal of Chemistry**, v. 59, p. 661–672, 2019.

HOWELL, P. L.; SKURNIK, D.; PIER, G. B. Identificação de poli-Nacetylglucosamine como um componente polissacarídeo principal da matriz do biofilme *Bacillus subtilis*. **J. Biol. Chem.**, v. 290, p. 19261–19272, 2015.

HUANG, L. *et al.* Electrochemical vitamin sensors: a critical review. **Talanta**, v. 222, p. 121645, 2021.

JAIN, R.; JADON, N.; PAWAIYA, A. Polypyrrole based next generation electrochemical sensors and biosensors. **A review, TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 97, p. 363-373, 2017.

JAIN, R.; JADSON, N.; Pawaiya, A. Sensores eletroquímicos e biossensores de próxima geração baseados em polipirrole: uma revisão. **Trac. Análise de Tendências. Chem**, v. 97, p. 363–373, 2017.

JAIN, S. *et al.* I-III-VI core/shell QDs: Synthesis, characterizations and applications. **Journal of Luminescence**, v. 219, 2020.

JAISWAL, N. *et al.* Electrochemical genosensor based on carboxylated graphene for detection of water-borne pathogen, **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 275, p. 312-321, 2018.

Karen Y. P. S. *et al.* Impedimetric sensing platform for human papillomavirus and p53 tumor suppressor gene in cervical samples. **Journal of Science: Advanced Materials and Devices**, v. 7, n. 1, 2022.

KAWAKITA, M. *et al.* O N-glicano da parede celular de *Candida albicans* melhora a hiperimunorreatividade precoce e tardia na sepse. **Comun Biol.**, v. 4, n. 1, p. 342, 2021.

KEY facts and figures: world hand hygiene day 2021. World Hand Hygiene Day 2021. **World Health Organization**, 2021. Disponível em: <https://www.who.int/campaigns/world-hand-hygiene-day/2021/key-facts-and-figures>. Acesso em 18 abr. 2021.

KHAN, M. D. *et al.* Aggravation of human diseases and climate change nexus. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 16, n. 15, 2019.

KILICAY, E. *et al.* Concanavaline A conjugated bacterial polyester-based PHBHHx nanoparticles loaded with curcumin for breast cancer therapy. **J Microencapsul**, v. 33, n. 3, p. 274-85, 2016.

KOTHAVADE, R. J. *et al.* Candida tropicalis: its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole. **Journal of medical microbiology**, v. 59, n. 8, p. 873-880, 2010.

KUBOTA, Y.; FUJIOKA, K.; TAKEKAWA, M. K. Eletroforese em gel de afinidade de lectina baseada em WGA: um novo método para a detecção de proteínas modificadas por O-GlcNAc. **PloS One**, v. 12, p. 1–12, 2017.

KUILA, T. *et al.* Recent advances in graphene-based biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v.26, n. 12, p. 4637-4648, 2011.

KUMAR, D.; RANI, S. Synthesis of Amide Functionalized Graphene Oxide for Humidity Sensing Application (Amide Functionalized Graphene Oxide for Humidity Sensing). **The Sixth International Conference on Sensor Device Technologies and Applications Synthesis**, p. 142-145, 2015.

KUMAR, K. *et al.* Candida glabrata: A Lot More Than Meets the Eye. **Microorganisms**, v. 7, n. 2, 2019.

KUMAR, Y. R. *et al.* Graphene quantum dot based materials for sensing, bio-imaging and energy storage applications. **reviewRSC Advances**, v. 10, 2020.  
LAM, J. M. Opportunistic Fungal Infection in children and management. **Current Opinion in Pediatrics**, v. 30, n. 4, p. 514–519, 2018.

LARA, A. E.; GIL, L. D. Case report: Meningoencephalitis caused by Candida krusei. **La Ciencia al Servicio**, 2017.

LAURI, A.; MARIANI, P. O. Potenciais e limitações dos métodos de diagnóstico molecular em segurança alimentar. **Genes Nutr**, v. 4, p. 1-12, 2009.

LEE, J. *et al.* A multi-functional gold/iron-oxide nanoparticle-CNT hybrid nanomaterial as virus DNA sensing platform. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 102, p. 425–431, 2018.

LEITE, D. R. S. **Desenvolvimento de sensor impresso nanoestruturado modificado com ftalocianina de cobalto para aplicação em Imunossensores**. 2016. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2016.

LI, Y. *et al.* Sequence-Designed Peptide Nanofibers Bridged Conjugation of Graphene Quantum Dots with Graphene Oxide for High Performance

Electrochemical Hydrogen Peroxide Biosensor. **Adv. Mater. Interfaces**, v. 4, 2017.

LISDAT, F.; SCHÄFER, D. The use of electrochemical impedance spectroscopy  
LIU, X. *et al.* Novel nanoarchitecture of Co-MOF-on-TPN-COF hybrid: Ultralowly sensitive biplatform of electrochemical aptasensor toward ampicillin. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 123, p. 59-68, 2019.

LIU, X.; DUCKWORTH, P. A.; WONG, D. K. Y. Voltametria de onda quadrada versus espectroscopia de impedância eletroquímica como uma técnica de detecção rápida em imunossensores eletroquímicos. **Biossensores e Bioeletrônica**, v. 25, n. 6, 2010.

Liu, Y., Dong, X., Chen, P., Biological and chemical sensors based on graphene materials. **Chemical Society Reviews**, n. 6, p. 2283–2307, 2012.

LONE, S. A.; AHMAD, A. Inhibitory effect of novel Eugenol Tosylate Congeners on pathogenicity of *Candida albicans*. **Medicina Complementar e Terapias BMC**, n. 131, 2020.

LONE, S. A.; AHMAD, A. Inhibitory effect of novel Eugenol Tosylate Congeners on

LOPEZ-TELLEZ, J. *et al.* Impedimetric biosensor based on a hechtia argentea lectin for the detection of salmonella spp. **Chemosensors**, v. 8, n. 4, p. 1–12, 2020.

LU, X. *et. al.* Bimetallic Pd/ Au nanorods based ultrasensitive acetylcholinesterase biosensor for determination of organophosphate pesticides. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 255, p. 2575-2581, 2018.

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

MAGARELLI, G.; PUPE, J. M.; SILVA, L. P. Detecção de nanopartículas de prata (AgNPs) e determinação de íons prata (Ag<sup>+</sup>) por técnicas voltamétricas. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2021.

MALHOTRA, D.; SUMANA, G. Genosensor eletroquímico baseado em grafeno carboxilado para detecção de patógenos transmitidos pela água, **Sens. Atuadores B: Chem.**, n. 275, p. 312–321, 2018.

MANDAL, D. K.; BREWER, F. C. Differences in the binding affinities of dimeric concanavalin A (including acetyl and succinyl derivatives) and tetrameric concanavalin A with large oligomannose-type glycopeptides. **Biochemistry**, v.32, p.5116-5120, 1993.

MABROUK, P. A.; Oxidative electropolymerization of pyrrole from neat monomer solution. **Synthetic Metals**, n. 150, p. 101-105, 2005.

MARANNI, A. C. **Identificação de bactérias utilizando espectroscopia Raman ou FTIR e análise multivariada: uma revisão sistemática.** Campo Grande, MS: UFMS, 2023.

MARIELE, M. P. et. al. Quartz Crystal Microbalance monitoring the real-time binding of lectin with carbohydrate with high and low molecular mass. **Microchemical Journal**, v. 89, n. 2, p. 153-158, 2008.

MASUOKA, J. Surface Glycans of *Candida albicans* and Other Pathogenic Fungi: Physiological Roles, Clinical Uses, and Experimental Chal. **Clinical microbiology reviews**, v. 17, n. 2, p. 281–310, 2004.

MCNAMARA, K.; SYED, A. M. T. Nanoparticles in biomedical applications, **Advances in Physics**: v. 2, n. 1, p. 54-88, 2017.

MEDEIROS, R. A.; ROCHA-FILHO, R. C.; FATIBELLO-FILHO, O. Simultaneous voltammetric determination of phenolic antioxidants in food using a boron-doped diamond electrode. **Food Chemistry**, v. 123, n. 3, p. 886- 891, 2010.

MERUM, S.; VELURU, J. B.; SANDEEP, K. K.; SEERAM, R. A review on carbon nanotubes in biosensor devices and their applications in medicine, **Nanocomposites**, v. 4, n. 2, p. 36-57, 2018.

MI, F. et al. Application of lectin-based biosensor technology in the detection of foodborne pathogenic bacteria. **A review. Analyst**, v. 146, n. 2, p. 429–443, 2021.

MI, F. et. al. Application of lectin-based biosensor technology in the detection of foodborne pathogenic bacteria: **a review. Analyst**, v. 146, p. 429–443, 2021.

MORALES, M.; HALPERN, J. M. Guia para selecionar um elemento de bioreconhecimento para biossensores. **Bioconjugate Chemistry**, v. 29, n. 10, p. 3231-3239, 2018.

MOTA, F. S.; OLIVEIRA, H. A.; SOUTO, R. C. F. Perfil e prevalência de resistência aos antimicrobianos de bactérias Gram-negativas isoladas de pacientes de uma unidade de terapia intensiva. **RBAC**, v. 50, n. 3, p. 270-277, 2018.

MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of Antibiotic Resistance. **Annual Reports in Medicinal Chemistry**, v. 4, n. 2, p. 119–127, 2016.

NAR, G.; HUBE, B. Importância da parede celular de *Candida albicans* durante comensalismo e infecção. **Curr. Opin. Microbiol**, v. 15, p. 406 – 412, 2012.

NAVARRO-ARAI, M. et. al. Differential recognition of *Candida tropicalis*, *Candida guilliermondii*, *Candida krusei*, and *Candida auris* by human innate immune cells. **Infection and Drug Resistance**, v. 12, n.783, 2019.

NAVARRO-ARIAS, M. J. *et al.* Differential recognition of *Candida tropicalis*, *Candida guilliermondii*, *Candida New* biorecognition molecules in biosensors for the detection of toxins, **Biosensors and Bioelectronics**, v. 87, p. 285-298, 2019.

NAVES, P. L. F. *et al.* Novas abordagens sobre os fatores de virulência de *Candida albicans*. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 12, n. 2, p. 229-233, 2013.

NEETHIRAJAN, S. *et al.* Recent advancement in biosensors technology for animal and livestock health management. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 98, p. 398-407, 2017.

NGO, T. T.; MORA-SERÓ, I. Interaction between Colloidal Quantum Dots and Halide Perovskites: Looking for Constructive Synergies. **Journal of Physical Chemistry Letters**, v. 10, n. 5, p. 1099–1108, 2019.

NGUYEN, T. N. Y. *et al.* O manano da parede celular de *Candida krusei* medeia a apoptose de células dendríticas e orquestra a polarização Th17 via via dependente de TLR-2/MyD88, **Sci. Rep.**, v. 8, n. 17123, 2018.

NOBREGA, F. A. C. **Biossensor impedimétrico contendo a lectina ConBr para detecção de carboidratos**. 2019. 78 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2019.

NOGUEIRA, A. V.; SILVA FILHO, G. N. **Microbiologia**. 1. ed. Florianópolis, 2015.

OLIVEIRA, L. S. *et al.* Flexible genosensors based on polypyrrole and graphene quantum dots for PML/RAR $\alpha$  fusion gene detection: A study of acute promyelocytic leukemia in children, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 235, 2023.

OLIVEIRA, M. D. L. *et al.* Impedimetric biosensor based on self- assembled hybrid cystein-gold nanoparticles and CramoLL lectin for bacterial lipopolysaccharide recognition. **J Colloid Interf Sci.**, v.362, p. 194-201, 2011.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Diretrizes para a qualidade da água potável**. vol. 4. Geneva, Organização Mundial da Saúde, 2004.

OST, K. S. *et al.* A imunidade adaptativa induz o mutualismo entre eucariontes comensais. **Natureza**, v. 596, n. 7870, p. 114–118, 2021.

PACHECO, W. F. *et al.* Voltametrias: Uma breve revisão sobre os conceitos. 111, **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 4, p. 516–537, 2013.

pathogenicity of *Candida albicans*. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 20, n. 131, 2020.

PERUMAL, V.; HASHIM, U. Avanços em biossensores: princípio, arquitetura e aplicações, J. **Appl. Biomed.**, v. 12, p. 1-15, 2014.

PIERMARINI, S. et al. Conjunto de imunossensores eletroquímicos usando uma microplaca serigrafada de 96 poços para detecção de aflatoxina B 1. **Biossensores e Bioeletrônica**, v. 22, p. 1434-1440, 2007.

PIERMARINI, S. et al. Matriz de imunossensores eletroquímicos usando uma microplaca impressa em tela de 96 poços para detecção de aflatoxina B1. **Biossensores e bioeletrônica**, v. 22, n. 7, p. 1434-1440, 2007.

PIGATTO, G.; LOVISON, O. V. A.; CATTANI, F. Prevalência de infecções fúngicas em um laboratório de análises clínicas da cidade de Veranópolis, Rio Grande do Sul. **Revista brasileira de análises clínicas**, v. 51, n. 3, p. 202-207, 2019.

POISSY, J. et al. Fatores de risco para candidemia: um estudo caso-controle prospectivo. **Cuidado Crítico**, v. 24, v. 109, 2020.

PORFÍRIO, F. F. O.; GIAROLA, J. D. F.; PEREIRA, A. C. Biosensor and beverages - review. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 5, p. 1.366-1.391, 2016.

PRICE, R. J. et al. A novel "bottom-up" synthesis of few- and multi-layer graphene platelets with partial oxidation via cavitation. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 56, p. 466-473, 2019.

RAGHU, A. V. Papel da condução de polímeros e híbridos à base de óxido metálico para aplicações em sensores e biossensores amperométricos, **Microchem. J.**, v. 147, p. 7–24, 2019.

RAZMI, H.; MOHAMMAD-REZAEI, R. Graphene quantum dots as a new substrate for immobilization and direct electrochemistry of glucose oxidase: Application to sensitive glucose determination. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 41, n. 1, p. 498–504, 2013.

RIBEIRO, D. V.; SOUZA, C. A. C.; ABRANTES, J. C. C. Use of Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS) to monitoring the corrosion of reinforced concrete. **Revista Ibracon de Estruturas e Materiais**, v. 8, n. 4, p. 529-546, 2015.

RIBEIRO, F. C. et. al. Action mechanisms of probiotics on Candida spp. and candidiasis prevention. **Appl Microbiology**, v. 129, n. 2, p. 175-185, 2019.

RIBEIRO, K. Impedimetric clavmo peptide-based sensor differentiates ploidy of candida species. **Biochemical Engineering Journal**, v. 167, 2021.

RISTIĆ, T. et. al. A study on the interaction of cationized chitosan with cellulose surfaces, **Cellulose**, n. 21, p. 2315-2325, 2014.

ROCHA, C. H. *et al.* Modelo alternativo de tratamento de vulvovaginite causada por *Candida glabrata* com uma fração de n-butanol das folhas de *Terminalia catappa*. **Rev Investig Bioméd**, v. 10, n. 2, p. 181-189, 2018.

ROCHA, C. H. L. *et al.* Virulence of clinical isolates of *Candida tropicalis*. **Rev Investig Bioméd**, v. 9, n. 2, p. 118-128, 2017.

ROCHA, W. R. V. *et al.* *Candida* genus: Virulence factores, Epidemiology, Candidiasis and Resistance mechanisms. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 4, p. 1-14, 2021.

RODRIGUES, D. E.; GUIMARÃES, S. L.; DUARTE, W. F. **Estudo sobre o emprego de quimiometria em espectroscopia de impedância eletroquímica**. UFPB/CCEN, 2019.

ROMANI, L.; BISTONI, F.; PUC CETI, P. Fungi, dendritic cells and receptors: a host perspective of fungal virulence. **Trends Microbiol.**, v. 10, n. 11, p. 508-14, 2002.

ROSA, J. O. *et al.* Detecção do gene *mecA* em estafilococos coagulase negativa resistentes à oxacilina isolados da saliva de profissionais da enfermagem. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** v. 42, n. 4, 2009.

ROUX, D. *et al.* Identificação de poli-Nacetylglucosamine como um componente polissacarídeo principal da matriz do biofilme *Bacillus subtilis*. **J. Biol. Chem.**, v. 290, p. 19261–19272, 2015.

ROUX, D. *et al.* Identification of Poly-N-acetylglucosamine as a Major Polysaccharide Component of the *Bacillus subtilis* Biofilm Matrix. **J Biol Chem.**, v. 290, n. 31, p. 19261-19272. 2015.

ROY, V.; ADAMS, B. L.; BENTLEY, W. E. Developing next generation antimicrobials by intercepting AI-2 mediated quorum sensing. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 49, n. 2, p. 113–123, 2011.

SÁ, S. *et al.* Lectin-based impedimetric biosensor for differentiation of pathogenic candida species, **Talanta**, v. 220, 2020.

SADEWASSER, S.; GLATZEL, T. (Editores). Kelvin Probe Force Microscopy. vol. 65. 2018.

SALEEM, Z. *et al.* Point prevalence surveys of health-care-associated infections: a systematic review. **Pathog Glob Health**, v. 113, n. 4, p. 191-205, 2019.

SALOMÃO, P. E. A. Production and Application of Biosensors: A Brief Review. **Research, Society and Development**, v. 3, 2018.

SALZER, R.; PETER, R.; GRIFFITHS, J. A. Fourier transform infrared spectrometry. **Anal Bioanal. Chem.**, v. 391, p. 2379–2380, 2008.

SANCHES, J. M. *et al.* Laboratorial Aspects of Cytolytic Vaginitis and Vulvovaginal Candidiasis as a Key for Accurate Diagnosis: A Pilot Study. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 42, n. 10, p. 634-641. 2020.

SANDFORD, C. *et al.* A synthetic chemist's guide to electroanalytical tools for studying reaction mechanisms. **Rev Chemical Science**, v. 10, n. 26, p. 6404-6422, 2019.

SANI, U. S. Circuit Elements Used in Electrochemistry. **The Journal of Science, Technology And Humanities**, v. 2, n. 2, p. 18–21, 2016.

Silva, C. T. **Sistema sensor baseado em nanocompósito de polipirrol-nanopartículas de ouro e óxido de grafeno aplicado à detecção de bactérias de interesse clínico**. 2023. [s.n.]. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, 2023.

SANTOS, M. R. *et al.* Desenvolvimento de um genossensor nanoestruturado baseado em polipirrol, nanopartículas de óxido de zinco e quitosana para a detecção eletroquímica do oncogene quiméricobcr/abl. In: ENCONTRO BRASILEIRO PARA INOVAÇÃO TERAPÊUTICA, 5., 2017, Recife. **Anais...** Recife, 2017.

SANTOS, P. S. **Cândida auris: emergência e epidemiologia de uma levedura altamente patogênica**. 2017. 19 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Universidade federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017.

SCHOLZ, F. **Electroanalytical Methods**. Berlin-Heidelberg: Springer, 2010.

SELVOLONI, G. *et al.* DNA-Based Snsor for the Detection of an Organophosphorus Pesticide: Profenofos. **Sensors**, v. 18, n. 7, 2018.

SENA, N. S. *et al.* Hospital infections in the Intensive Care Unit: An integrative review. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 10, p. 1-9, 2022.

SHANMUGAM, N. R.; MUTHUKUMAR, S.; PRASAD, S. A review on ZnO-based electrical biosensors for cardiac biomarker detection. **Future Science Oa**, v. 3, n. 4, p. 1-15, 2017.

SHAO T. Y. *ET. AL.* COMENSAL CANDIDA ALBICANS CALIBRA POSITIVAMENTE AS RESPOSTAS imunológicas sistêmicas Th17. **Micróbio hospedeiro celular**, v. 25, n. 3. P. 404–417, 2019.

SHENG, S. *et al.* Facile assembly of graphene on anion exchange resin microspheres for electrochemical sensing and biosensing. **Chemistry - An Asian Journal**, v. 8, n. 1, p. 191-197, 2013.

SHI, L. *et al.* A highly sensitive and reusable electrochemical mercury biosensor based on tunable vertical single-walled carbon nanotubes and a target recycling strategy. **Journal of Materials Chemistry B.**, v. 5, n. 5, p. 1.073-1.080, 2017.

SHKALIM-ZEMER, V. *et al.* Response of Symptomatic Persistent Chronic Disseminated Candidiasis to Corticosteroid Therapy in Immunosuppressed Pediatric Patients: Case Study and Review of the Literature. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 37, n. 7, p. 686-690, 2018.

SHOAIE, N. *et al.* Electrochemical sensors and biosensors based on the use of polyaniline and its nanocomposites: a review on recent advances. **Microchimica Acta**, v. 186, n. 7, p. 1-29, 2019.

SILVA JUNIOR, A. *et al.* Concanavalin A differentiates gram-positive bacteria through hierarchized nanostructured transducer. **Microbiological Research**, v. 251, 2021.

SILVA, D. B. D. S. *et al.* Novel point mutations in the ERG11 gene in clinical isolates of azole resistant *Candida* species. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 3, p. 192–199, 2016.

SILVA, D. M. D. *et al.* Virulence factors of *Candida* species from the oral mucosa and prostheses of elderly people from a riverside community in the Amazon state, Brazil. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 48, 2019.

SILVA, K. *et al.* Morfologia, epidemiologia e virulência de espécies do gênero *Candida*. In: PEÑA, I. V. **Tópicos de ciências na saúde**. vol. 4. Nova Xavantina: Pantanal editora, 2021.

SILVA, P. M. S. *et al.* Nanoelectrode of lectin of *Cratylia mollis* for differential diagnosis of prostate cancer and benign prostatic hyperplasia based on label-free detection. **Biosensores e Bioeletrônica**, v. 85, p. 171-177, 2016.

SILVA, P. M. S. *et al.* *Cratylia mollis* lectin nanoelectrode for differential diagnosis of prostate cancer and benign prostatic hyperplasia based on label-free detection. **Biosens Bioelectron**, v. 15, n. 85, p. 171-177, 2016.

SILVA, R. B. **Candidemia em um hospital público do nordeste do Brasil: características epidemiológicas e fatores de risco em pacientes críticos**. 2017. 67f. Dissertação (Mestrado em Patologia) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2017.

SILVA, S. L. *et al.* Onychomycoses due to fungi of the genus *Candida*: a literature review. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 8, p. 1-26, 2020.

Silva, T. M. F., *et al.* Infecções hospitalares associadas à bacilos gram-negativos não fermentadores em unidade de terapia intensiva: revisão narrativa. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 13, n. 3, 2021.

SIMÃO, E. P. *et al.* Nanostructured impedimetric lectin-based biosensor for arboviruses detection. **Talanta**, v. 208, p. 1-7, 2020.

SINGH, D. P. *et al.* Graphene oxide: An efficient material and recent approach for biotechnological and biomedical applications. **Materials Science and Engineering C**, v. 1, n. 86, p. 173-197, 2018.

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

SIQUEIRA, J. P. Z.; ALMEIDA, M. T. G. Molecular Biology as a tool for fungal detection on blood: diagnostic aid and cost reduction. **Arch Health Sci**, v. 25, n. 3, p. 41-45, 2018.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. **Princípios de Análise Instrumental**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed-Bookman, 2002. 806p.

SLAGER, J. *et al.* Antibiotic-induced replication stress triggers bacterial competence by increasing gene dosage near the origin. **Cell**, v. 157, n. 2, p. 395–406, 2014.

SMITH, B. C. **Fundamentals of Fourier Transform Infrared Spectroscopy**. CRC Press, 2011. 207p.

SOARES, P. A. O, LOPES, H. A.; MEDEIROS, R. A. Prevalence of infections caused by Gram-negative bacteria in the intensive care unit of a hospital of Teixeira de Freitas, Bahia. **Revista Mosaicum.**, v. 27, 2018.

SOBEL, J. *et al.* Kartsonis, Caspofungin in the Treatment of Symptomatic Candiduria, **Clinical Infectious Diseases**, v. 44, n. 5, p. 46–49, 2007.

SOUTO, R. G. *et al.* Prevenção da infecção cruzada em profissionais de saúde. **Revista Acadêmica Saúde e Educação**, v. 1, 2023.

SPALANZANI, R. N.; SANTOSWEISS, I. C. Principais métodos de diagnóstico laboratorial e de avaliação da susceptibilidade antifúngica de Candida sp. IN: SILVA NETO, B. R. **Micologia: Fungos e/ou seus Metabólitos como Objeto de Estudo**. Editora Atena, 2020. p. 134-148.

STANISZEWSKA, M. Virulence Factors in Candida species. **Curr Protein Pept Sci.**, v. 21, n. 3, p. 313-323, 2020.

STROYUK, O.; RAEVSKAYA, A.; GAPONIK, N. Solar light harvesting with multinary metal chalcogenide nanocrystals. **Chemical Society Reviews**, v. 47, p. 5354-5422. 2018.

STUART, B. H. **Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications**. John Wiley & Sons Ltd, 2004.

STUART, B. **Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications**. Wiley, 2004. 244 p.

TABISH, T. A. *et al.* Investigating the bioavailability of graphene quantum dots in lung tissues via Fourier transform infrared spectroscopy. **Interface Focus**, v. 6, n. 8, 2018.

TANIMOTO, S.; ICHIMURA, A. Discrimination of Inner- and Outer-Sphere Electrode Reactions by Cyclic Voltammetry Experiments. **Journal of Chemical Education**, v. 90, n. 6, p. 778-781, 2013.

TANG, X.; An ammonia sensor composed of polypyrrole synthesized on reduced graphene oxide by electropolymerization, **Sensors and Actuators B: Chemical**. V. 305, 2020.

TATAR, A. S. *et al.* Nanomedicine approaches in acute lymphoblastic leukemia. **Journal of Controlled Release**, 2016.

TAVARES, W. **Antibióticos e quimioterápicos para o clínico**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2009.

TEIXEIRA, D. A. **Microbiologia Básica**. Faculdade presidente Antônio Carlos de Teófilo Otoni: Teófilo Otoni, 2020. 64p.

TEIXEIRA, V.C. **Nanotecnologia e Diagnóstico na Medicina**. 2021. 43p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia-Bioquímica) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

TELES, F. R. R.; FONSECA, L. P. Applications of polymers for biomolecule immobilization in electrochemical biosensors. **Materials Science and Engineering: C**, v. 28, n. 8, p. 1530-1543, 2008.

TIAN, P. *et al.* Graphene quantum dots from chemistry to applications. **Materials Today Chemistry**, v. 10, p. 221-258, 2018.

TORTORA, G. J.; Funke, B. R.; & Case, C. L. **Microbiologia**. Porto Alegre: Artmed, 2017.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbiology: An Introduction. 13 ed. Pearson, 2019.

TSO, G. H. W. *et al.* Evolução experimental de um patógeno fúngico em um simbionte intestinal. **Journal of Applied Microbiology**, v. 129, p. 175-185, 2018.

VALAND, N. *et al.* Inactivation of the Complement Lectin Pathway by Candida tropicalis Secreted Aspartyl Protease-1. **Immunobiology**, v. 227, n. 6, p.152263, 2022.

VALENTE, A., LOPES, T.; REIS, M. (2021). Comparação da sensibilidade e especificidade entre dois métodos de identificação de Candida albicans. **Enciclopédia Biosfera**, v. 18, n. 35, p. 66-80, 2021.

VIDANA, R. *et al.* Potential for nosocomial transmission of *Enterococcus faecalis* from surfaces in dental operatories. **International Endodontic Journal**, v. 48, n. 6, p. 518–527, 2015.

VILLAMIZAR, R. A.; MAROTO, A.; RIUS, F. X. Detecção melhorada de *Candida albicans* com transistores de efeito de campo de nanotubos de carbono, Sensor. **Atuador do. B Chem.**, v. 136, p. 451–457, 2009.

Wang H. *et al.* (2021). Isolation, identification and genotyping of *Candida albicans* from Landes geese. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 69, n. 2, p. 349-359, 2022.

WANG, M. *et al.* Analysis of multidrug-resistant bacteria in 3223 patients with hospital-acquired infections (HAI) from a tertiary general hospital in China. **Bosnian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 19, n. 1, p. 86–93, 2018.

WANG, T. *et al.* Biossensor baseado em nanopartículas ultrapequenas de MoS<sub>2</sub> para detecção eletroquímica de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> liberado pelas células em nível nanomolar. **Química Analítica**, v. 85, n. 21, p. 10289-10295, 2013.

WILSON, D. N. Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. **Nat Rev Microbiol.**, v. 12, n. 1, p. 35–48, 2014.

WONG, A. *et al.* A new electrochemical platform based on low cost nanomaterials for sensitive detection of the amoxicillin antibiotic in different matrices. **Talanta**, v. 206, p. 120252, 2020.

WONG, J. H; WONG, C. C. T; NG, T. B. Purificação e caracterização de uma lectina específica de galactose é atividade itogênica de feijão carioca. **Biophys. Acta**, p. 808-813, 2006.

WU, J. Y *et al.* Analyses of the global multilocus genotypes of the human pathogenic yeast *Candida tropicalis*. **Frontiers in microbiology**, v. 10, 2019.

XIANG, Q.; YU, J.; JARONIEC, M. Graphene-based semiconductor photocatalysts. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 2, p. 782-796, 2012.

XIE, R. *et al.* Graphene quantum dots as smart probes for biosensing. **Anal. Methods**, v. 8, p. 4001–4016, 2016.

XU, T. S. Bioconjugation of peroxidase-like nanostructures with natural enzyme for in-situ amplified conductometric immunoassay of tissue polypeptide antigen in biological fluids. **Biochemical Engineering Journal**, v. 105, p. 36-43, 2012.

XUE, Y. *et al.* 2014. Quantifying thiol–gold interactions towards the efficient strength control. **Nat. Commun.**, v. 5, p. 1–9, 2014.

YAGHOUBI, M. *et al.* A lectin-coupled porous silicon-based biosensor: label-free optical detection of bacteria in a real-time mode, **Scientific reports.**, n. 10, 2020.

YANG, H. *et al.* Detection of Escherichia coli with a label-free impedimetric biosensor based on lectin functionalized mixed self-assembled monolayer. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 229, p. 297–304, 2016.

ZANONI, M. V. B. *et al.* Panorama da eletroquímica e eletroanalítica. **Química Nova**, v. 40, n. 6, p. 663-669, 2017.

ZDRACHEK, E.; BAKKER, E. Potentiometric Sensing. **Analytical Chemistry**, v. 91, n. 1, p. 2–26, 2019.

ZHAO, C. *et al.* Synthesis of graphene quantum dots and their applications in drug delivery. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 18, n. 142, p. 2-32, 2020.

**ANEXO****9 ARTIGO 1 – NEW BIOELECTRODE BASED ON GRAPHENE QUANTUM DOTS-POLYPYRROLE FILM AND CONCAVALIN A FOR PATHOGENIC MICROORGANISMS DETECTION**

ARTIGO A SER SUBMETIDO NA REVISTA “*Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*”.

**New bioelectrode based on graphene quantum dots-polypyrrole film  
and Concanavalin A for pathogenic microorganisms detection**

Maria P. M. C. Santos <sup>1</sup>, Léony S. de Oliveira <sup>1</sup>, Reginaldo G. Lima-Neto<sup>2</sup>, Cesar A.S.  
Andrade <sup>1,3</sup>, Maria D.L. Oliveira<sup>1,3\*</sup>

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

<sup>2</sup> Departamento de Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE),  
Recife, Pernambuco, Brazil.

<sup>3</sup> Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901  
Recife, PE, Brazil.

\*To whom correspondence should be addressed.

Maria D.L. Oliveira, Departamento de Bioquímica, UFPE, 50670-901, Recife, PE,  
Brazil. Phone: +55-81-2126.8450; Fax: +55-81-2126.8547.

E-mail: [m\\_danielly@yahoo.com.br](mailto:m_danielly@yahoo.com.br)

## ABSTRACT

Infections caused by microorganisms are a public health problem, so actions such as the development of new biodetection systems are the aims to diagnose and treat infections. Electrochemical impedance spectroscopy (EIS) and cyclic voltammetry (CV) associated with graphene quantum dots and polypyrrole film have unique electrical and chemical properties, which make them important elements for biosensing applications. However, the lectin Concanavalin A (ConA) has specific binding capacity to carbohydrates and stands out for being low cost when compared to other receptor biomolecules. We propose a ConA-conjugated graphene quantum dots and polypyrrole film based biosensor for real-time and label-free detection of *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *E. coli* and *S. aureus*. We modified PPY-QDGs with lectin ConA, with glucose and mannose specificity, as bioreceptor. The results showed that ConA has the highest binding affinity for *C. tropicalis* and *S. subtilis* showing biorecognition capable. PPY-GQDs-ConA binding profile revealed differential response for *Candida* spp (*C. tropicalis* > *C. albicans* > *C. glabrata*) and bacterial (*B. subtilis* > *S. aureus* > *E. coli*), respectively. For *Candida* spp., the limits of detection (LOD) obtained was 1.42 CFU/mL for *C. albicans* and 3.72 CFU/mL for *C. glabrata*. The study of *C. tropicalis* yielded an LOD of 0.18 CFU/mL. The respective LODs for the evaluated bacteria was 0.39 CFU/mL for *S. aureus*, 0.72 CFU/mL for *S. subtilis*, and LOD of 2.63 CFU/mL for *E. coli*. Differential response behavior for ConA can be attributed to the heterogenous distribution of carbohydrates on the microorganisms surfaces. The new system proves to be a miniaturized tool on an innovative flexible substrate that could contribute to microbiological diagnosis.

**Keywords:** *Concanavalin A; Quantum dots; Micoorganisms; Biosensor; Impedance spectroscopy.*

## 1. Introduction

Hospital-acquired infections are obtained in hospital units during or after hospitalization. Criteria for diagnosis include clinical symptoms and laboratory confirmation after 72 hours of hospitalization, or in cases of invasive procedures, within a shorter period [1]. In Brazil, it is observed that healthcare-associated infections represent the fourth leading cause of death in Intensive Care Units [2].

It is possible to highlight that in the hospital environment infections can arise from a wide variety of pathogens, and this diversity can vary depending on the region, population served, health systems, and medical facilities in each nation [3]. Some of these microorganisms, such as fungal species and bacteria, can become opportunistic and cause infections, especially in hospital environments, where there is a wide variety of pathogens. These healthcare-associated infections are a global concern, affecting patients with different medical conditions [4].

*Candida* spp. is the most common group of fungi in human infections and is also associated with polymicrobial infections, in which complex interactions occur between microorganisms. These interactions can influence virulence and pathogenicity, in addition to affecting the host immune response [5].

The *Candida* group includes around 150 species, but only 13 of them are harmful to humans, such as *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* and *C. krusei*, coexisting with several bacterial species, such as *S. epidermidis*, *S. aureus* and *B. subtilis* as Gram positive group and *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Enterobacter spp* as Gram negative group [6, 7].

*Candida*'s extracellular matrix is mainly composed of 10% proteins and 90% carbohydrates, with polysaccharides found in the cell wall, which include mannans,  $\beta$ -glucans and chitin, forming an immunological signature [8]. In general, carbohydrates

play a predominant role in the process of immune recognition, while proteins play a crucial role in adhesive interactions with host cell surfaces [9].

Delays in diagnosing candidemia and bacteremia are linked to elevated mortality rates [10]. In this context, it is crucial to carry out an accurate and complete diagnosis, including identification of the species involved, which is essential to ensure early and effective treatment. Therefore, traditional diagnostic methods are considered as a reference, like culture, being a widely used diagnostic approach. However, identifying yeasts of the genus *Candida* spp and gram negative and positive bacteria through cultures is time-consuming, taking two to three days for results. This delay results in less accurate diagnoses and, consequently, delays the implementation of the therapeutic measures necessary to treat infections effectively [11]. The PCR technique stands out for its accuracy when differentiating between genotypes, however it has disadvantages due to the delay, high reagent costs and the need for specialists to be carried out [12].

Nevertheless, diverse studies have demonstrated the applicability of biosensors as a diagnostic method for microorganisms [13]. Nanostructures associated to electroanalytical techniques, such as electrochemical impedance spectroscopy (EIS) and cyclic voltammetry (CV), have been extensively used for the development of nanobiosensors [14]. Nanomaterials such as graphene quantum dots, carbon nanotubes, carbon dots, metallic nanoparticles, have common characteristics such as excellent electron transfer ability and electrical conductivity [15]. The special use of quantum dots nanomaterial in electrochemical biosensors are capable of providing a large surface area, high electrochemical activity and possibility of functionalization [16]. Graphene quantum dots (QDGs) can provide a natural environment for the immobilization of biomolecules and facilitate electron transfer due to their large surface area, electrochemical properties and good biocompatibility [17].

Lectins are currently being extensively explored in the field of biosensors as a biorecognition molecule because of their specific interaction properties with free or conjugated carbohydrate residues, which is of interest when it comes to bacteria detection in human serological samples [18]. Concanavalin A (Con A) is a type of lectin with specificity to Gly/Man capable of differentiating glycoproteins presents in serum from microorganisms-infected patients. The lectin-based sensor has shown good sensitivity and potential to the development of new platforms nanostructured for microorganisms diagnosis [12].

In this paper, we report the development of a new biosensor platform based on a self-assembled nanostructured film based on polypyrrole, QDGs and lectin ConA chemically modified (Fig. 1), for residues detection of mannose-glucose on surfaces of *C. albicans*, *C. Glabata*, *C. tropicalis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* and *S. aureus*. Stands out, the proposed biosensor platform was effective for diagnosis of important microorganisms involved in biomedical infections.

## **2. Methodology**

### **2.1. Materials**

Pyrrole, graphene quantum dots, Concanavalin A lectin, N-hydroxysuccinimide (NHS), 1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl] carbodiimide hydrochloride (EDC), bovine serum albumin (BSA), purchased from Sigma-Aldrich (USA). Ferric chloride and ferrous chloride were obtained from Vetec (Brazil). Microorganisms were provided by Prof. Reginaldo Gonçalves de Lima Neto, from the Department of Tropical Medicine/UFPE. The material collected from patient samples was provided by Prof. Reginaldo Gonçalves, with authorization from the UFPE ethics committee. Reagents and solvents used will be of analytical grade.

## 2.2. Electrode modification: PPy-GQDs-ConA-BSA sensor platform

The first step towards construction involved the electropolymerization of polypyrrole (PPy) on the flexible ITO (indium tin oxide) electrode. For this, the flexible electrode was immersed in a solution containing 0.5 M hydrochloric acid and 30 nM pyrrole monomer. Using the cyclic voltammetry technique, six polymerization cycles occurred in a potential range of -0.4 to +1 V, with a scan rate of 100 mV.s<sup>-1</sup>. After this step, 5 µL of graphene quantum dots were absorbed into the PPy layer for 10 minutes. Then, 2 µL of a 0.4:0.1 M EDC:NHS solution was added to the electrode surface for 20 minutes to promote the chemical bond between PPy and graphene quantum dots. Finally, 5 µL of the lectin Concanavalin A was immobilized on the surface of the PPy-QDGs layer over a period of 15 minutes, after the aforementioned EDC:NHS-mediated activation. To block the remaining active sites, a solution of 2 µL of 1% (w/v) bovine serum albumin was used for 30 seconds. All stages of biosensor construction were characterized using cyclic voltammetry (CV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS) techniques.

## 2.3. Biorecognition study

Microorganisms from the Tropical Diseases Diagnostic Laboratory were used, confirmed by MALDI-TOF MS. The bacteria (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*) were cultivated in nutrient agar and incubated at 35°C. Yeasts (*Candida albicans*, *Candida tropicalis* and *Candida glabrata*) were also cultivated and identified using mass spectrometry. The inoculum preparation followed the McFarland 0.5 standard and was standardized in a spectrophotometer for subsequent tests. For the biorecognition tests of the ConA biosensor against microorganisms, five saline suspensions were prepared at concentrations of 10<sup>1</sup>, 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup>, and 10<sup>5</sup> CFU/mL.

Subsequently, 5  $\mu$ L of these suspensions were applied to the biosensor surface and incubated for 15 minutes. Following that, the sensor surface was rinsed, and electrochemical measurements, including cyclic voltammetry (CV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS), were performed.

### **2.3. Electrochemical measurements**

Electrochemical analyses were performed using a PGSTAT 128N potentiostat/galvanostat (Autolab, Netherlands). CV measurements were performed at a scan rate of 50  $\text{mV s}^{-1}$  in a range of potentials between -0.2 and +0.7 V. EIS was obtained in a frequency range of 100 mHz to 100 kHz, with an amplitude of the applied sine wave potential of 10 mV. Electrochemical measurements were carried out in a conventional three-electrode electrochemical cell, platinum wire as auxiliary electrode, Ag/AgCl (saturated with KCl) electrode as reference electrode, and ITO electrode as working electrode, housed inside a Faraday cage, in the presence of a 10mM ( $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ ) used as a redox probe. All measurements were performed in triplicate using three different samples ( $n=3$ ). The reproducibility of the ConA Biosensor was calculated through the standard deviation of voltammetric assays from three biosensors constructed separately using the same experimental procedure. Repeatability was estimated using the relative standard deviation (RSD) of biorecognition assays at a concentration of  $10^1$  CFU/mL, employing the equation:  $RSD (\%) = (\text{Standard deviation} / \text{Average}) \times 100$ .

### **2.4 . Atomic force microscopy measurements**

Topographic analyses were performed with an SPM9700 atomic force microscope (Shimadzu instruments Co. Ltd, Japan) in a non-contact mode at room temperature ( $\sim 25$  °C). Cantilevers with a silicon AFM probes (Nanoworld, Japan, resonant frequency = 190 kHz, spring constant =  $42 \text{ N m}^{-1}$ ) were used. The images (512 points per line) were collected with a scan rate of 1.0 Hz in a scan area of  $5 \times 5 \text{ }\mu\text{m}$ . Gwyddion software was used for analysis and processing of the images.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Topographic and structural characterization

In the three-dimensional study of the biosensor assembly steps, each layer exhibited intrinsic characteristics related to the material used in self-assembly. In Figure 2a, we observe the layer corresponding to the electropolymerized PPy film on the ITO flexible electrode surface. The characteristic behavior of this polymer is evident, presenting a nodular aspect and a maximum surface peak of  $0.14 \text{ }\mu\text{m}$  ( $R_a = 19 \text{ nm}$  and  $RMS = 25.92 \text{ nm}$ ), consistent with previous works [19]. With the adsorption of graphene quantum dots (GQDs), a noticeable topographical change occurs on the surface, showing a significant increase in the maximum surface peak to  $0.16 \text{ }\mu\text{m}$ . Additionally, there is an elevation in the roughness average ( $R_a$ ) to  $24.23 \text{ nm}$  and root mean square (RMS) to  $31.58 \text{ nm}$ . This surface heterogeneity is associated with the formation of nanomaterial aggregates on the PPy (Fig 2b) [20, 21]. Upon immobilization of ConA on GQDs, the maximum surface peak reaches  $0.34 \text{ }\mu\text{m}$ , and there is an increase of  $22.48 \text{ nm}$  in the average surface roughness ( $R_a = 46.71 \text{ nm}$  and  $RMS = 56.62 \text{ nm}$ ). This profile results from the covalent immobilization directed by the EDC/NHS agent, keeping ConA on the surface of GQDs (Fig 2c) [12]. In the last construction step with the addition of bovine serum albumin (BSA), the sensor surface exhibits a maximum peak of  $0.38 \text{ }\mu\text{m}$ ,

confirming the self-assembly of the platform ( $R_a = 53.4$  nm and  $RMS = 61.32$  nm) (Fig 2d). BSA is used to block nonspecific sites due to its ability to interact on cationic surfaces [22]. When the ConA biosensor is exposed to a bacterial suspension of *E. coli*, there is an elevation of the maximum surface peak to  $0.53$   $\mu\text{m}$ , with  $R_a = 90.9$  nm and  $RMS = 111.1$  nm (Fig 2e). Similarly, exposure to a fungal suspension of *C. albicans* results in an elevation of the maximum surface peak to  $0.61$   $\mu\text{m}$  ( $R_a = 96.3$  nm and  $RMS = 127.6$  nm) (Fig 2f). This behavior indicates the binding of these microorganisms to the surface, demonstrating the ConA lectin's recognition capacity [23].

### 3.2. Electrochemical characterization

#### 3.2.1 Standardization of Electropolymerization and Nanostructuring

The study began with an examination of the ideal electropolymerization cycle for PPy. Electropolymerization of PPy offers significant advantages compared to other techniques due to its stability, thickness control, polymer oxidation, and the achievement of an active electrocatalytic film [24]. Thus, the voltammetric response of the film obtained in 6 and 20 electropolymerization cycles was investigated (Fig. S1a and b). The PPy film formed with 20 cycles exhibited lower peak currents compared to the film formed with 6 cycles (Fig. S1c). This behavior is linked to monomer consumption in the medium, leading to changes in the thickness and conductivity of the film's outer layers [25]. Consequently, the 6th electropolymerization cycle was deemed ideal due to its stability and higher values of anodic and cathodic peak currents in cyclic voltammetry (CV). This choice aligns with the pattern established in previous works [19]. In the second stage of biosensor construction, GQDs were adsorbed onto the PPy surface. This adsorption is attributed to the interaction between the positively charged cationic polymer and the negatively charged carboxylic groups of the quantum dots [21, 26]. A study of

adsorption time was conducted to determine the ideal parameter for construction. It was observed that longer GQDs adsorption times resulted in a greater decline in anodic and cathodic currents in CV assays (Fig. S2). Thus, a 15-minute adsorption time was selected as ideal since it does not cause a significant loss of amperometric signal and allows the formation of a satisfactory nanostructured layer

### *3.2.1 Electrochemical Characterization of the Assembly Steps of the Biosensor*

After standardizing of the PPy-GQDs nanostructuration, all steps were characterized using cyclic voltammetry (CV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS). The anodic and cathodic peak currents from the CV assays can be found in Table S1. The EIS assays were quantitatively assessed using the Randles circuit as the equivalent circuit of the platform, where the components were solution resistance ( $R_s$ ), constant phase element (CPE), charge transfer resistance ( $R_{CT}$ ), and Warburg impedance (W) (Fig S2). The values can be consulted in Table S2.

In the cyclic voltammetry evaluation, it was observed that PPy presented broad current peaks ( $I_{PA} = 280.78 \pm 28.03 \mu A$  and  $I_{PC} = - 247.49 \pm 22.68 \mu A$ ) (Fig. 3a). This behavior is expected from a conductive polymer film with high electron transfer and stability [24]. In the EIS assays, there was almost no significant semicircle formation in the high-frequency region of the Nyquist diagram ( $R_{CT} = 31.23 \pm 1.31 \Omega$ ) (Fig. 3b). This indicates low resistance to charge transfer between the polymeric surface and the electroanalytical solution [27].

In the second layer of structuring with GQDs, a decrease in  $I_{PA}$  and  $I_{PC}$  occurred because the negative portion of the redox pair in the electroanalytical solution was repelled by the negative charges of the COOH in the nanostructures ( $I_{PA} = 255 \pm 39.15 \mu A$  and  $I_{PC} = - 258 \pm 40 \mu A$ ). In the EIS assay, this behavior is reflected in the appearance

of a semicircle in the impedance spectrum and an increase in  $R_{CT}$  ( $R_{CT} = 65.62 \pm 2.29 \Omega$ ) (Fig. 3b). These findings also corroborate with previous studies [21].

In the third assembly step, the immobilization of concanavalin A (ConA) lectin was performed. For this, the activation of carboxylic groups of GQDs was carried out using the EDC/NHS agent. Covalent bonds formed between the -NH groups available in the protein chain and the activated -COOH groups of the quantum dots. In the electrochemical characterization by CV, the coating of the PPy-QGDs surface with ConA was evidenced by the decrease in current peaks in the CV assays ( $I_{PA} = 228.94 \pm 3.26 \mu A$  and  $I_{PC} = -213.87 \pm 2.57 \mu A$ ) (Fig. 3a). In an inversely proportional response, there was an increase in the semicircle diameter in the EIS ( $R_{CT} = 170 \pm 17.3 \Omega$ ) (Fig. 3b). This is due to the partial blockage of electron transfer from the surface by the protein chain.

Finally, bovine serum albumin was used to block nonspecific sites on the surface. This blocking resulted in a slight decrease in voltametric response ( $I_{PA} = 200.44 \pm 1.91 \mu A$  and  $I_{PC} = -227.9 \pm 0.5 \mu A$ ) (Fig. 3a) and an increase in the impedimetric response ( $R_{CT} = 243 \pm 5.7 \Omega$ ) (Fig. 3b).

### 3.3. Biorecognition study

The ConA biosensor was assessed against microorganisms, including *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis* and *Candida glabrata*. In cyclic voltammetry (CV) assays with different *Candida* spp. species, a decrease in peak currents was observed corresponding to an increase in CFU (Fig. 4a, c, and e). This process occurs due to the interaction of ConA with the yeast cell walls. ConA has the ability to recognize and bind to specific carbohydrate residues with high affinity [12]. In the electrochemical impedance spectroscopy (EIS) evaluation, an increase in the semicircle diameter in the Nyquist diagrams was observed in accordance

with the yeast concentration, corroborating the voltametric results (Fig. 4b, d, and f). *Candida* spp. have a high proportion of carbohydrates in their cell walls, such as d-glucose (Glc), N-acetyl-d-glucosamine (GlcNAc), and d-mannose (Man) [9]. Thus, ConA can bind more effectively to glucose and mannose residues on the surface of these microorganisms. Similar electrochemical behaviors were observed in the CV (Fig. 2a, c, and e) and EIS (Fig. 2b, d, and f) assessments with bacteria. These electrochemical changes are associated with the formation of the ConA-Bacteria recognition complex. ConA binds to the bacterial wall through the recognition of glucose and mannose saccharide residues. This confirms the possibility of ConA biorecognition against microorganisms of distinct natures. The surface carbohydrates of bacteria can vary mainly with host interaction, environmental conditions, and exposure to antibiotics. The ability to cause damage to the host and colonization is closely linked to immune system evasion, and these factors are closely linked to the polysaccharide surface of bacteria, which is capable of preventing phagocytosis by phagocytic cells [28]. These factors indicate a well-developed strategy for the detection and differentiation of microorganisms using lectins such as ConA.

### ***3.4. Microorganisms differentiation assay***

In the study of response differentiation, the percentage surface coverage ( $\theta\%$ ) of the sensor surface during biorecognition was taken into consideration.  $\theta\%$  was calculated using the equation:  $\theta\% = [1 - (R_{CT} \text{ Biosensor} / R_{CT} \text{ microorganisms}) \times 100]$ . It was observed in this study that yeasts exhibited a differential response among themselves and compared to bacteria, with the highest biorecognition in the following order: *C. tropicalis* > *C. albicans* > *C. glabrata*. This distinction in response is attributed to differences in the surface carbohydrate profiles among *Candida* species. Additionally, the variability in

the content and configuration of mannose on the surface of *C. albicans* may result in adhesion inhibition, serving as an evasion mechanism from the immune system [8].

In the differential evaluation of bacterial strains, a subtle distinction in  $\theta\%$  occurred. Gram-positive bacteria, *B. subtilis* and *S. aureus*, demonstrated greater surface coverage from the first evaluated concentration, while the gram-negative bacterium, *E. coli*, exhibited lower coverage. Thus, the recognition order was: *B. subtilis* > *S. aureus* > *E. coli*. It was observed that the Gram-positive bacteria, *B. subtilis* and *S. aureus*, showed a greater impedimetric response and consequent coating than the Gram-negative *E. coli*. This finding may be related to the greater carbohydrate residues found on the surface of Gram-positive bacteria compared to Gram-negative ones [29]. Another factor that may have influenced this electrochemical response is the size of the microorganism. The larger the layer formed on the sensor surface, the greater the partial blockage of electron transfer between the biosensor and the electroanalytical solution. This process impacts  $R_{CT}$  values and is reflected in surface coverage [30]. *B. subtilis*, with a size of approximately 4 – 10  $\mu\text{m}$  [31], showed a greater impedimetric response. Additionally, a similar impedimetric response occurred between *S. aureus* and *E. coli*, which have sizes ranging from 0.1 – 1.5  $\mu\text{m}$  and 1 – 1.5  $\mu\text{m}$ , respectively [32]. However, the distinction between bacterial types was not significant, and various interferents in this differentiation mechanism may occur when evaluating real patient samples.

As a final overview, the ConA biosensor was capable of differentiating *Candida* species from each other and also from bacteria. Furthermore, the biosensor was able to detect bacteria without clear differentiation among them. For *Candida* spp., the limits of detection (LOD) and limit of quantification (LQ) obtained were 1.42 and 2.3 CFU/mL for *C. albicans*, with a linear regression equation of  $y = 0.079 + 0.16 \text{ Log}(x)$  and  $R^2 = 0.97$ . *C. glabrata* obtained LOD = 3.72 CFU/mL and LQ = 5.59 CFU/mL, with a linear

equation of  $y = 0.008 + 0.15 \text{ Log}(x)$  and  $R^2 = 0.92$ . The study of *C. tropicalis* yielded an LOD of 0.18 CFU/mL and an LQ of 0.13 CFU/mL, with a linear equation of  $y = 0.278 + 0.071 \text{ Log}(x)$  and  $R^2 = 0.99$ . The respective LODs and LQs for the evaluated bacteria were 0.39 and 0.14 CFU/mL for *S. aureus* ( $y = 0.556 + 0.035 \text{ Log}(x)$  and  $R^2 = 0.99$ ), LOD = 0.72 CFU/mL and LQ = 0.145 CFU/mL for *B. subtilis* ( $y = 0.645 + 0.018 \text{ Log}(x)$  and  $R^2 = 0.99$ ), and LOD of 2.63 CFU/mL and LQ of 1.29 CFU/mL for *E. coli* ( $y = 0.457 + 0.049 \text{ Log}(x)$  and  $R^2 = 0.94$ ). The ConA biosensor exhibited a reproducibility of 1.91% and repeatability of 21% for *Candida* spp. and 27% for bacteria.

### **3.4. Biotechnological application of Lectins in microbiological biosensors**

Given the critical need for rapid detection of microorganisms, particularly within hospital environments, several microbiological biosensors have been developed [10]. Additionally, considering the biotechnological potential exhibited by lectins, these proteins are widely employed as bioreceptors [33]. Table 1 provides a comparison of various studies utilizing lectins for microbiological diagnosis. Sá et al developed an impedimetric biosensor on a gold electrode using ConA and wheat germ lectin (WGA) for the detection and differentiation of *Candida* species, achieving a sensitive platform with a LOD of  $10^2$  CFU/mL [12]. Oliveira et al utilized Cramoll lectin for the devaluation of glucose and manose in *Candida* spp. through fluorescence microscopy and quantum dots [34]. Silva et al employed ConA to develop an electrochemical biosensor capable of detecting and differentiating between gram-negative and gram-positive bacteria, with a LOD of  $10^1$  CFU/mL [28]. Using WGA decoring nanoparticles and chitosan, Punjabi et al detected bacteria through an optical biosensor with a LOD of  $10^5$  CFU/mL [35].

Although numerous studies focus on microorganism detection through lectins, few address the actual potential for miniaturization of the developed systems. In this

regard, this study utilized flexible ITO strips to construct the ConA biosensor on a distinct substrate and innovative nanostructured platform, demonstrating a greater potential for miniaturization. Furthermore, the nanostructured biosensor exhibited excellent analytical sensitivity with extremely low LODs.

#### 4. Conclusion

The ConA biosensor has been developed on a flexible and electroactive substrate, providing a greater potential for miniaturization. Moreover, the use of materials such as PPy and GQDs has contributed to the electroanalytical signal, resulting in increased sensitivity in the system. Additionally, the biosensor demonstrated the ability to differentiate between fungi of the *Candida* spp. and bacteria. It was also possible to distinguish between the species *C. tropicalis*, *C. albicans*, and *C. glabrata* with a high sensible detection. Thus, the ConA biosensor proves to be a miniaturized tool on an innovative flexible substrate with an attractive bioanalytical performance that could contribute to microbiological diagnosis.

#### Acknowledgments

Maria P. M. C. Santos and Léony S. de Oliveira would like to thank FACEPE and CAPES for a master and PhD scholarships. M.D.L. Oliveira and C.A.S. Andrade would like to thank the Brazilian National Council of Scientific and Technological Development/CNPq (grant numbers 304678/2021–0 and 304680/2021–4) and Foundation for Science and Technology of the State of Pernambuco.

#### REFERENCES

[1] W. H. ORGANIZATION, Improving infection prevention and control at the health facility: interim practical manual supporting implementation of the WHO guidelines on

- core components of infection prevention and control programmes, World Health Organization.No. WHO/HIS/SDS/2018.10 (2018) doi: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/279788/WHO-HIS-SDS-2018.10-eng.pdf>.
- [2] I. A. Braga, P. A. Campos, P. P. Gontijo-Filho ,R. M. Ribas, Multi-hospital point prevalence study of healthcare-associated infections in 28 adult intensive care units in Brazil, *The Journal of hospital infection*.99 (2018) 318-324. doi: 10.1016/j.jhin.2018.03.003.
- [3] R. Balasubramanian, T. P. Van Boeckel, Y. Carmeli, S. Cosgrove ,R. Laxminarayan, Global incidence in hospital-associated infections resistant to antibiotics: An analysis of point prevalence surveys from 99 countries, *PLoS medicine*.20 (2023) e1004178. doi: 10.1371/journal.pmed.1004178.
- [4] B. Allegranzi, S. Bagheri Nejad, C. Combescure, W. Graafmans, H. Attar, L. Donaldson ,D. Pittet, Burden of endemic health-care-associated infection in developing countries: systematic review and meta-analysis, *Lancet*.377 (2011) 228-241. doi: 10.1016/S0140-6736(10)61458-4.
- [5] K. Diongue, A. S. Badiane, M. C. Seck, M. Ndiaye, M. A. Diallo, S. Diallo, O. Sy, J. L. Ndiaye, B. Faye, O. Ndir ,D. Ndiaye, [Qualitative fungal composition of services at risk of nosocomial infections at Aristide Le Dantec Hospital (Dakar)], *Journal de mycologie medicale*.25 (2015) e39-43. doi: 10.1016/j.mycmed.2014.10.020.
- [6] D. L. Allison, H. M. E. Willems, J. Jayatilake, V. M. Bruno, B. M. Peters ,M. E. Shirtliff, Candida-Bacteria Interactions: Their Impact on Human Disease, *Microbiology spectrum*.4 (2016) doi: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0030-2016.
- [7] C. E. Stanley, M. Stockli, D. van Swaay, J. Sabotic, P. T. Kallio, M. Kunzler, A. J. deMello ,M. Aebi, Probing bacterial-fungal interactions at the single cell level, *Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro*.6 (2014) 935-945. doi: 10.1039/c4ib00154k.
- [8] G. M. Boxx, T. R. Kozel, C. T. Nishiya ,M. X. Zhang, Influence of mannan and glucan on complement activation and C3 binding by *Candida albicans*, *Infection and immunity*.78 (2010) 1250-1259. doi: 10.1128/IAI.00744-09.
- [9] N. A. R. Gow, J. P. Latge ,C. A. Munro, The Fungal Cell Wall: Structure, Biosynthesis, and Function, *Microbiology spectrum*.5 (2017) doi: 10.1128/microbiolspec.FUNK-0035-2016.
- [10] W. Fang, J. Wu, M. Cheng, X. Zhu, M. Du, C. Chen, W. Liao, K. Zhi ,W. Pan, Diagnosis of invasive fungal infections: challenges and recent developments, *Journal of biomedical science*.30 (2023) 42. doi: 10.1186/s12929-023-00926-2.
- [11] P. Hassanpour, A. Spotin, H. Morovati, L. Aghebati-Maleki, M. Raeisi, M. A. Rezaee, A. Hasani, A. Aghebati-Maleki, H. Abdollahzadeh ,S. Nami, Molecular diagnosis, phylogenetic analysis, and antifungal susceptibility profiles of *Candida* species isolated from neutropenic oncological patients, *BMC infectious diseases*.23 (2023) 765. doi: 10.1186/s12879-023-08774-z.
- [12] S. R. Sa, A. G. Silva Junior, R. G. Lima-Neto, C. A. S. Andrade ,M. D. L. Oliveira, Lectin-based impedimetric biosensor for differentiation of pathogenic *Candida* species, *Talanta*.220 (2020) 121375. doi: 10.1016/j.talanta.2020.121375.
- [13] M. Dabrowski, P. S. Sharma, Z. Iskierko, K. Noworyta, M. Cieplak, W. Lisowski, S. Oborska, A. Kuhn ,W. Kutner, Early diagnosis of fungal infections using piezomicrogravimetric and electric chemosensors based on polymers molecularly imprinted with d-arabitol, *Biosensors & bioelectronics*.79 (2016) 627-635. doi: 10.1016/j.bios.2015.12.088.
- [14] H. Wang, L. Yang, Y. Tan, W. Deng ,Q. Xie, Ag<sub>2</sub>S quantum dots loaded dendritic mesoporous silica nanospheres as signal amplification labels for ultrasensitive

- electrochemical immuno-biosensor for *Staphylococcus aureus*, *Journal of Electroanalytical Chemistry*.919 (2022) 116496. doi: 10.1016/j.jelechem.2022.116496.
- [15] C. Pandit, H. K. Alajangi, J. Singh, A. Khajuria, A. Sharma, M. S. Hassan, M. Parida, A. D. Semwal, N. Gopalan, R. K. Sharma, A. Suttee, U. Soni, B. Singh, S. Sapra, R. P. Barnwal, G. Singh, I. P. Kaur, Development of magnetic nanoparticle assisted aptamer-quantum dot based biosensor for the detection of *Escherichia coli* in water samples, *Science of The Total Environment*.831 (2022) 154857. doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.154857.
- [16] J. Gupta, K. Das, A. Tanwar, P. Rajamani, J. Bhattacharya, An electrochemical study of the binding interaction between chitosan and MPA-CdSe QDs for the development of biocompatible theranostic nanoprobe, *Journal of Molecular Liquids*.358 (2022) 119193. doi: 10.1016/j.molliq.2022.119193.
- [17] Z. You, Q. Qiu, H. Chen, Y. Feng, X. Wang, Y. Wang, Y. Ying, Laser-induced noble metal nanoparticle-graphene composites enabled flexible biosensor for pathogen detection, *Biosensors and Bioelectronics*.150 (2020) 111896. doi: 10.1016/j.bios.2019.111896.
- [18] H. Yang, H. Zhou, H. Hao, Q. Gong, K. Nie, Detection of *Escherichia coli* with a label-free impedimetric biosensor based on lectin functionalized mixed self-assembled monolayer, *Sensors and Actuators B: Chemical*.229 (2016) 297-304. doi: 10.1016/j.snb.2015.08.034.
- [19] K. Avelino, L. S. Oliveira, N. Lucena-Silva, C. A. S. Andrade, M. D. L. Oliveira, Flexible sensor based on conducting polymer and gold nanoparticles for electrochemical screening of HPV families in cervical specimens, *Talanta*.226 (2021) 122118. doi: 10.1016/j.talanta.2021.122118.
- [20] D. P. Kević, Z. M. Marković, S. P. Jovanović, D. B. Peruško, M. D. Budimir, I. D. Holclajtner-Antunović, V. B. Pavlović, B. M. Todorović, Marković, Preparation of PEDOT:PSS thin films doped with graphene and graphene quantum dots, *Synthetic Metals*.198 (2014) 150-154. doi: 10.1016/j.synthmet.2014.10.017.
- [21] L. S. Oliveira, K. Avelino, S. Oliveira, N. Lucena-Silva, H. P. de Oliveira, C. A. S. Andrade, M. D. L. Oliveira, Flexible genosensors based on polypyrrole and graphene quantum dots for PML/RAR $\alpha$  fusion gene detection: A study of acute promyelocytic leukemia in children, *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*.235 (2023) 115606. doi: 10.1016/j.jpba.2023.115606.
- [22] T. Ristić, T. Mohan, R. Kargl, S. Hribernik, A. Doliška, K. Stana-Kleinschek, L. Fras, A study on the interaction of cationized chitosan with cellulose surfaces, *Cellulose*.21 (2014) 2315-2325. doi: 10.1007/s10570-014-0267-6.
- [23] M. Yaghoubi, F. Rahimi, B. Negahdari, A. H. Rezayan, A. Shafiekhani, A lectin-coupled porous silicon-based biosensor: label-free optical detection of bacteria in a real-time mode, *Scientific reports*.10 (2020) 16017. doi: 10.1038/s41598-020-72457-x.
- [24] X. Tang, J.-P. Raskin, N. Kryvutsa, S. Hermans, O. Slobodian, A. N. Nazarov, M. Debliquy, An ammonia sensor composed of polypyrrole synthesized on reduced graphene oxide by electropolymerization, *Sensors and Actuators B: Chemical*.305 (2020) 127423. doi: 10.1016/j.snb.2019.127423.
- [25] P. A. Mabrouk, Oxidative electropolymerization of pyrrole from neat monomer solution, *Synthetic Metals*.150 (2005) 101-105. doi: 10.1016/j.synthmet.2005.01.011.
- [26] N. Jaiswal, C. M. Pandey, A. Soni, I. Tiwari, M. Rosillo-Lopez, C. G. Salzmann, B. D. Malhotra, G. Sumana, Electrochemical genosensor based on carboxylated graphene for detection of water-borne pathogen, *Sensors and Actuators B: Chemical*.275 (2018) 312-321. doi: 10.1016/j.snb.2018.07.055.

- [27] F. Wolfart, D. P. Dubal, M. Vidotti, R. Holze, P. Gómez-Romero, Electrochemical supercapacitive properties of polypyrrole thin films: influence of the electropolymerization methods, *Journal of Solid State Electrochemistry*.20 (2015) 901-910. doi: 10.1007/s10008-015-2960-2.
- [28] A. G. da Silva Junior, I. A. M. Frias, R. G. Lima-Neto, S. R. Sa, M. D. L. Oliveira, C. A. S. Andrade, Concanavalin A differentiates gram-positive bacteria through hierarchized nanostructured transducer, *Microbiological research*.251 (2021) 126834. doi: 10.1016/j.micres.2021.126834.
- [29] T. J. Silhavy, D. Kahne, S. Walker, The bacterial cell envelope, *Cold Spring Harbor perspectives in biology*.2 (2010) a000414. doi: 10.1101/cshperspect.a000414.
- [30] R. Saxena, S. Srivastava, An insight into impedimetric immunosensor and its electrical equivalent circuit, *Sensors and Actuators B: Chemical*.297 (2019) 126780. doi: 10.1016/j.snb.2019.126780.
- [31] A. J. M. Wollman, K. Muchova, Z. Chromikova, A. J. Wilkinson, I. Barak, M. C. Leake, Single-molecule optical microscopy of protein dynamics and computational analysis of images to determine cell structure development in differentiating *Bacillus subtilis*, *Computational and structural biotechnology journal*.18 (2020) 1474-1486. doi: 10.1016/j.csbj.2020.06.005.
- [32] J. Jass, S. Schedin, E. Fallman, J. Ohlsson, U. J. Nilsson, B. E. Uhlin, O. Axner, Physical properties of *Escherichia coli* P pili measured by optical tweezers, *Biophysical journal*.87 (2004) 4271-4283. doi: 10.1529/biophysj.104.044867.
- [33] M. Naseri, M. Maliha, M. Dehghani, G. P. Simon, W. Batchelor, Rapid Detection of Gram-Positive and -Negative Bacteria in Water Samples Using Mannan-Binding Lectin-Based Visual Biosensor, *ACS sensors*.7 (2022) 951-959. doi: 10.1021/acssensors.1c01748.
- [34] W. F. Oliveira, M. P. Cabrera, N. R. M. Santos, T. H. Napoleao, P. M. G. Paiva, R. P. Neves, M. V. Silva, B. S. Santos, L. Coelho, P. E. Cabral Filho, A. Fontes, M. T. S. Correia, Evaluating glucose and mannose profiles in *Candida* species using quantum dots conjugated with Cramoll lectin as fluorescent nanoprobe, *Microbiological research*.230 (2020) 126330. doi: 10.1016/j.micres.2019.126330.
- [35] K. Punjabi, R. R. Adhikary, A. Patnaik, P. Bendale, S. Saxena, R. Banerjee, Lectin-Functionalized Chitosan Nanoparticle-Based Biosensor for Point-of-Care Detection of Bacterial Infections, *Bioconjugate chemistry*.33 (2022) 1552-1563. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.2c00299.

**Table Captions**

**Table 1.** Comparison between biotechnological applications for microorganisms detections based in lectins.

## Figure Captions

**Fig. 1.** Schematic representation of the application of the ConA Biosensor in the microbiological diagnosis.

**Fig. 2.** AFM images of the stepwise modification process: PPy (a), PPy-GQDs (b), PPy-GQDs-ConA (c), PPy-GQDs-ConA-BSA (d), ConA Biosensor - *E. coli* (e) and ConA Biosensor - *C. albicans* (f).

**Fig. 3.** Cyclic voltammogram (a) and Nyquist diagram (b) of the stepwise modification of the ConA Biosensor.

**Fig. 4.** Electrochemical characterization of biorecognition assays of *C. albicans* (a) Cyclic voltammogram and Nyquist diagram (b), *C. tropicalis* (c) CV and (d) EIS and *C. glabrata* (e) CV and (f) EIS.

**Fig. 5.** Electrochemical characterization of biorecognition assays of *E. coli* (a) Cyclic voltammogram and Nyquist diagram (b), *S. aureus* (c) CV and (d) EIS and *B. subtilis* (e) CV and (f) EIS

**Fig. 6.** Degree of surface coating ( $\theta\%$ ) assays for differentiation of biorecognition performance of ConA Biosensor (a) and (b) three-dimensional plot of *Candida* spp. (c) and three-dimensional plot of bacteria.

**Table 1.** Comparison between biotechnological applications for microorganisms detections based in lectins

| Platform  | Lectin    | Limit of detection             | Microorganism   | Transduction method     | Reference |
|---|-----------|--------------------------------|---|-------------------------|-----------|
| GE - Cys-MBA-AuNPs  | ConA, WGA | 10 <sup>2</sup><br>CFU/<br>mL  | <i>C. albicans</i> ,<br><i>C.tropicalis</i> ,<br><i>C.krusei</i> ,<br><i>C.parapsilosis</i> | EIS                     | [17]      |
| CdTe QDs  | Cramoll   | -                              | Candida spp   | Fluorescence microscopy | [47]      |
| Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @Chit_<br>ConA and<br>Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @Au | ConA      | 10 <sup>0</sup><br>CFU/<br>mL  | <i>K.pneumoniae</i><br>,<br><i>B.subtilis</i> ,<br><i>E.faecalis</i>                        | EIS                     | [42]      |
| Chitosan nanoparticles  | WGA       | 10 <sup>5</sup><br>CFU/m<br>L  | <i>S. aureus</i> ,<br><i>E.coli</i>   | Microscopy              | [48]      |
| ITO-PPy-GQDs  | ConA      | >10 <sup>0</sup><br>CFU/m<br>L | Candida spp.<br><i>B.subtilis</i><br><i>S.aureus</i> ,<br><i>E.coli</i>                     | CV, EIS                 | This work |

Cys: Cysteine. MBA: Mercaptobenzoic acid. AuNps; Gold nanoparticles. CdTe QDs: Cadmium telluride quantum dots. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>: Magnetite nanoparticles. Chit: Chitosan. ITO: Indium tin oxide. PPy: Polypyrrole. GQDs Graphene quantum dots. ConA: concavalin A. WGA: wheat germ lectin. Cramoll: *Cratylia mollis*.

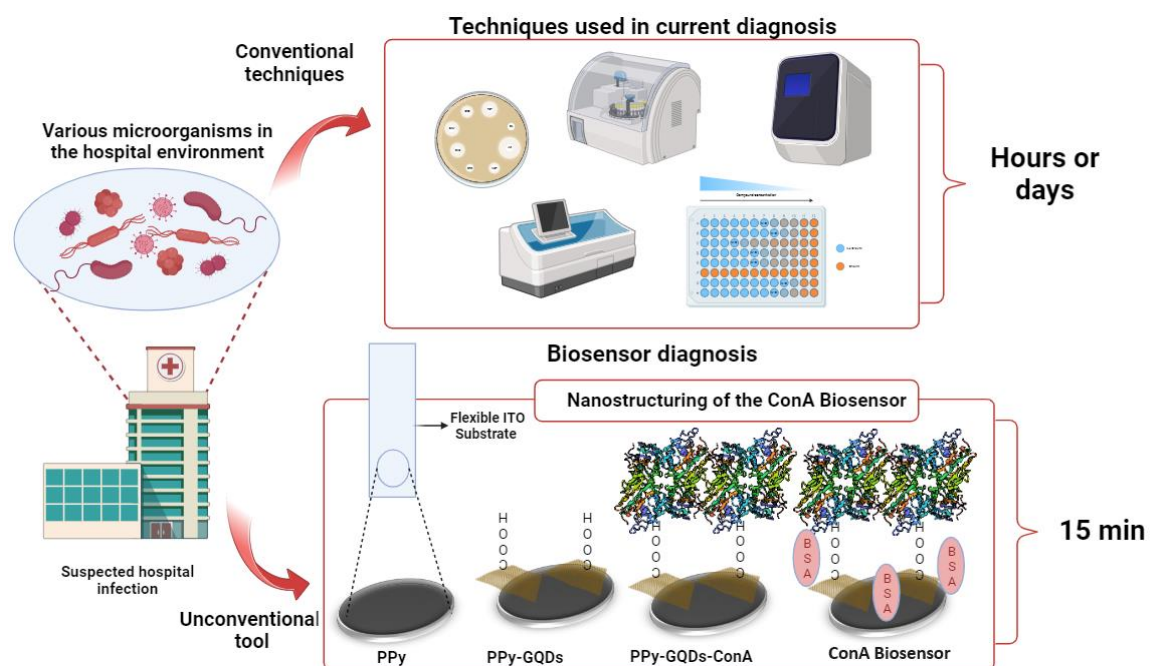


Fig. 1

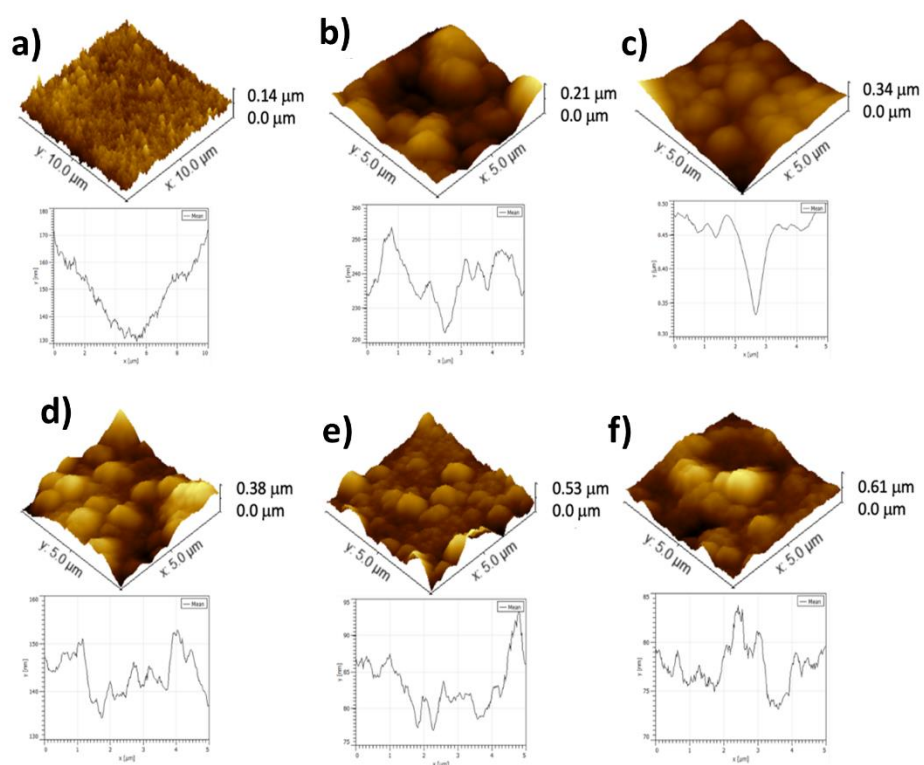


Fig. 2

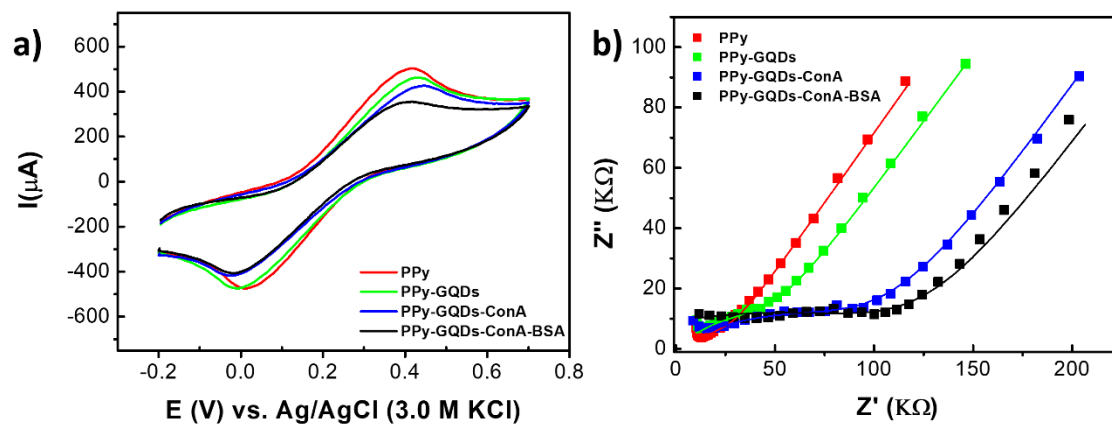


Fig. 3

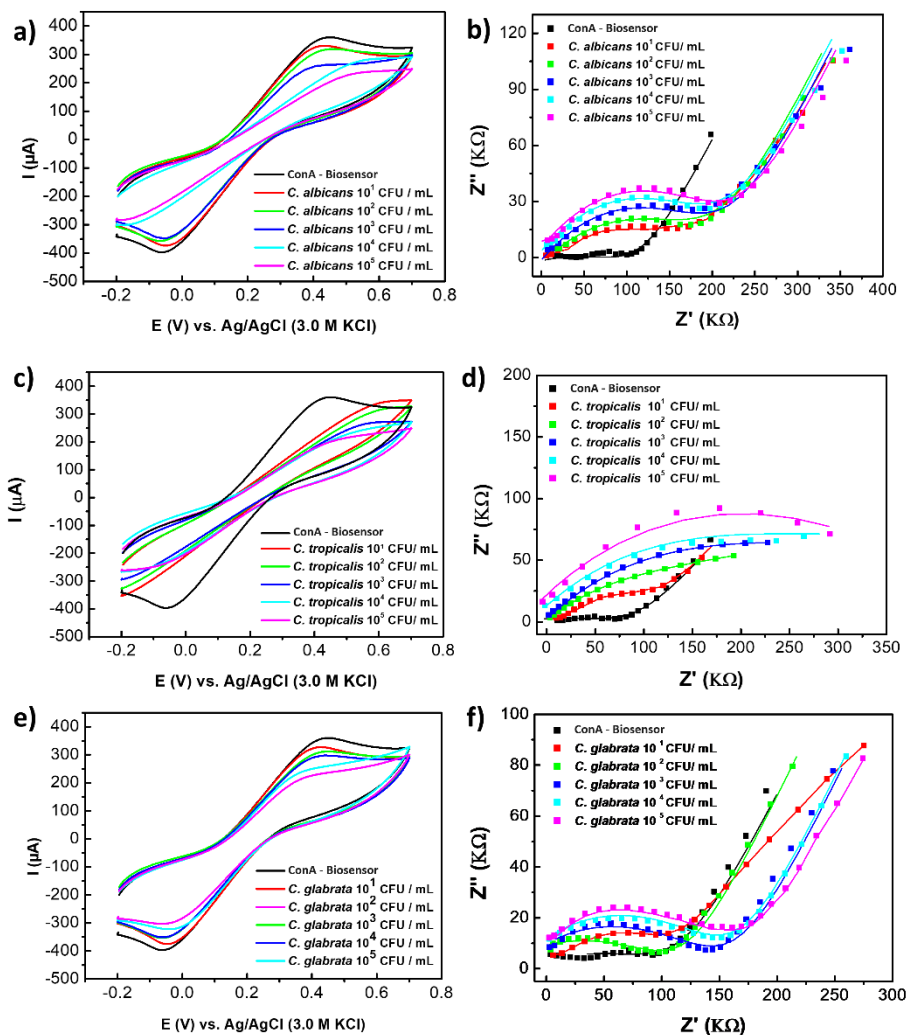


Fig. 4

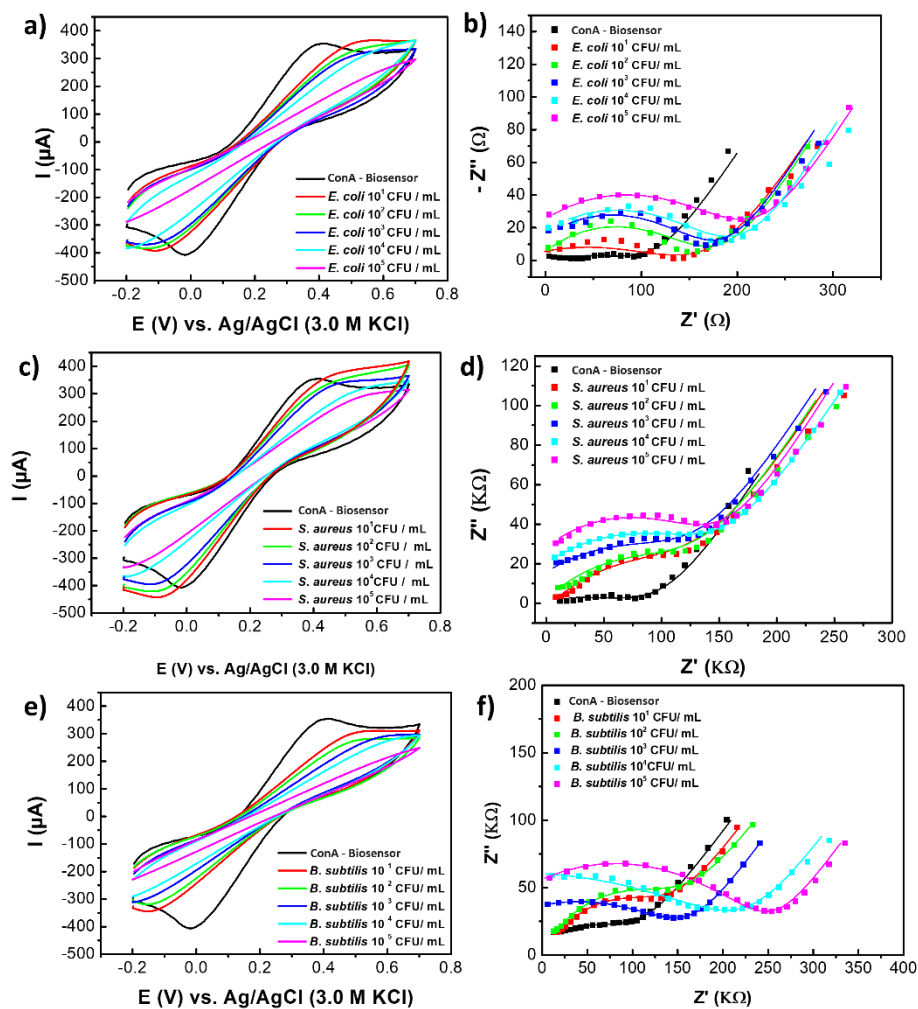


Fig. 5

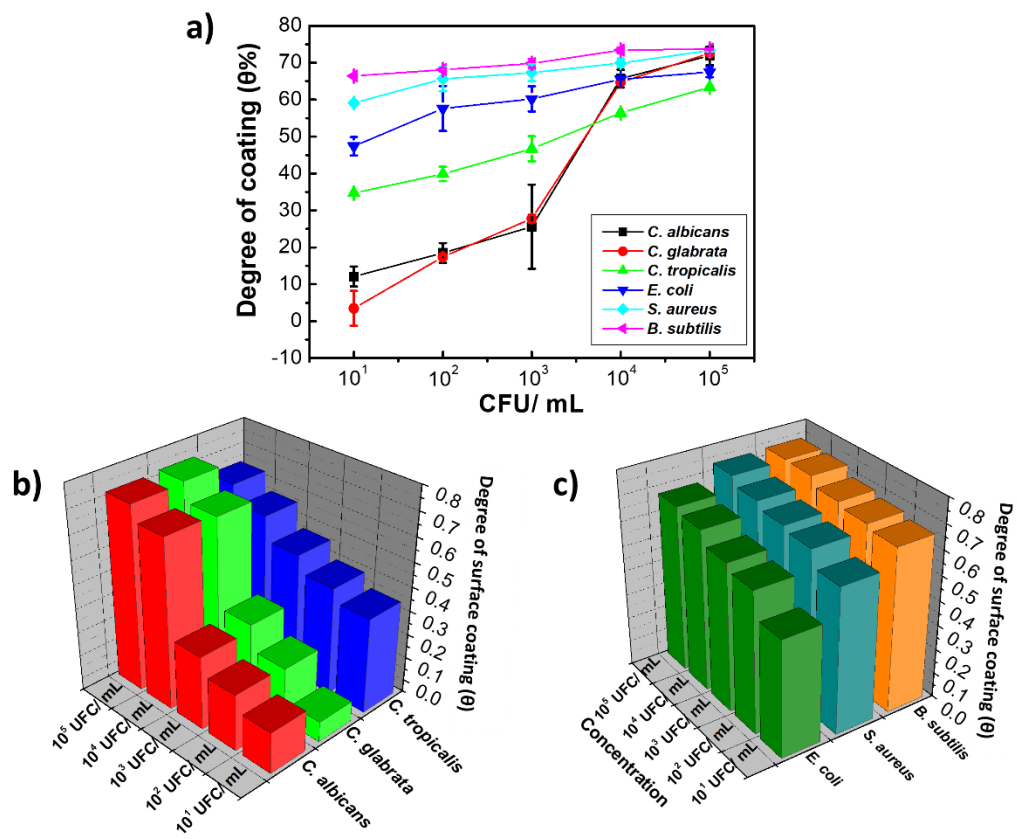


Fig. 6

### Supplementary material

New bioelectrode based on graphene quantum dots-polypyrrole film and  
Concanavalin A for pathogenic microorganisms detection

Maria P. M. C. Santos <sup>1</sup>, Léony S. de Oliveira <sup>1</sup>, Reginaldo G. Lima-Neto<sup>2</sup>, Cesar A.S.  
Andrade <sup>1,3</sup>, Maria D.L. Oliveira<sup>1,3\*</sup>

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

<sup>2</sup> Departamento de Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE),  
Recife, Pernambuco, Brazil.

<sup>3</sup> Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901  
Recife, PE, Brazil.

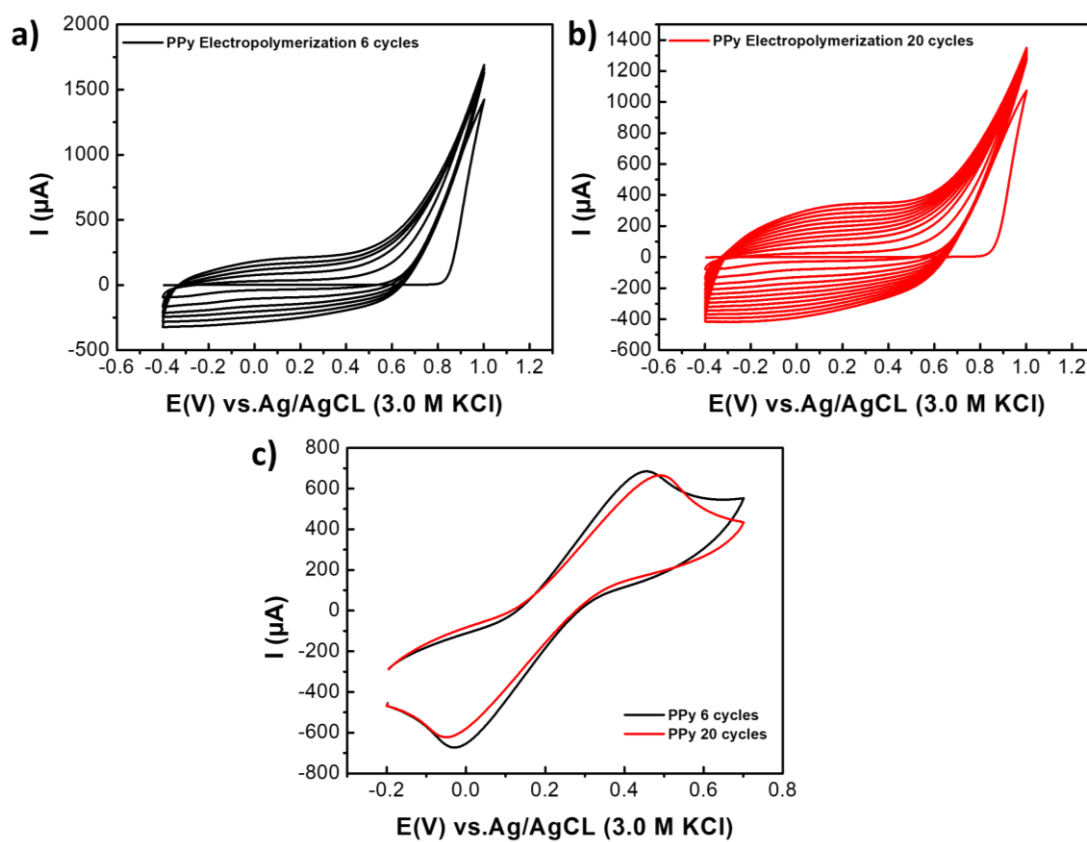
\*To whom correspondence should be addressed.

Maria D.L. Oliveira, Departamento de Bioquímica, UFPE, 50670-901, Recife, PE, Brazil.

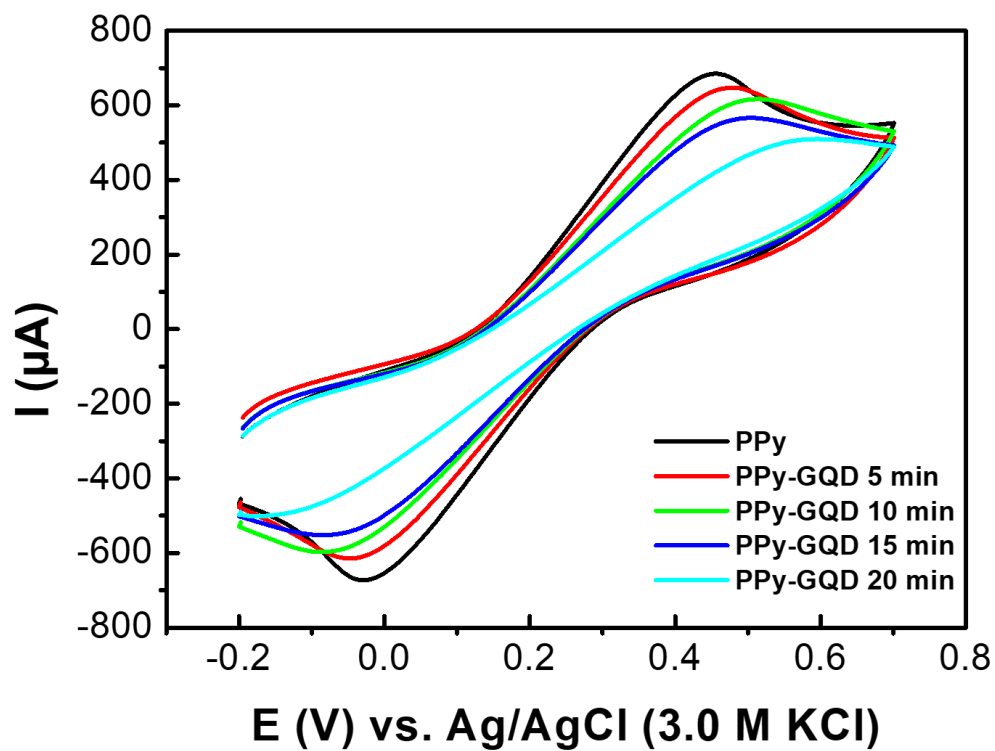
Phone: +55-81-2126.8450; Fax: +55-81-2126.8547.

E-mail: [m\\_danielly@yahoo.com.br](mailto:m_danielly@yahoo.com.br)

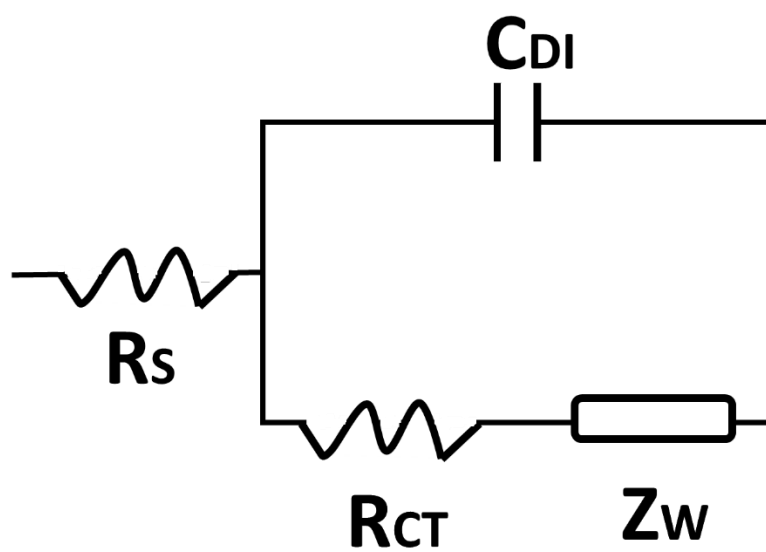
**Figure S1.** Voltammetric study of polypyrrole electropolymerization parameters.



**Figure S2.** Voltammetric study of the ideal immobilization time of graphene quantum dots (GQDs).



**Figure S3.** Randles equivalent circuit used in the quantification of impedance tests.



**Table S1.** Amperometric study of the construction steps of the Biosensor ConA.

| Construction step                         | I <sub>pa</sub> (μA) | I <sub>pc</sub> (μA) |
|---|----------------------|----------------------|
| ITO-PPy                                   | 280.78 ± 28.03       | - 247.49 ± 22.68     |
| ITO-PPy-GQDs                              | 255 ± 39.15          | - 258 ± 40           |
| ITO-PPy-GQDs-ConA                         | 228.94 ± 3.26        | - 213.87 ± 2.57      |
| ITO-PPy-GQDs-ConA-BSA<br>(Biosensor ConA) | 200.44 ± 1.91        | - 227.9 ± 0.5        |

**Table S2.** Values of the equivalent circuit elements obtained from fitting the impedance results for each step of construction of the Biosensor ConA.

| Construction step                         | $R_s$ ( $\Omega$ ) | CEP ( $\mu$ F)  | $R_{CT}$ ( $\Omega$ ) | W               | N                 |
|---|--------------------|-----------------|-----------------------|-----------------|-------------------|
| ITO-PPy                                   | $286 \pm 0.81$     | $2.54 \pm 0.23$ | $31.23 \pm 1.31$      | $6.91 \pm 0.31$ | $0.395 \pm 0.01$  |
| ITO-PPy-GQDs                              | $344 \pm 0.008$    | $1.66 \pm 0.13$ | $65.66 \pm 2.29$      | $6.94 \pm 0.17$ | $0.365 \pm 0.01$  |
| ITO-PPy-GQDs-ConA                         | $394 \pm 3.92$     | $7.61 \pm 0.65$ | $170 \pm 17.3$        | $7.71 \pm 0.79$ | $0.301 \pm 0.029$ |
| ITO-PPy-GQDs-ConA-BSA<br>(Biosensor ConA) | $285 \pm 1.88$     | $6.26 \pm 0.2$  | $243 \pm 5.71$        | $9.19 \pm 4.33$ | $0.210 \pm 0.15$  |