



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
Departamento de Bioquímica

CAIQUE TAVARES DA SILVA

**SISTEMA SENSOR BASEADO EM NANOCOMPÓSITO DE
POLIPIRROL-NANOPARTÍCULAS DE OURO E ÓXIDO DE
GRAFENO APLICADO A DETECÇÃO DE BACTÉRIAS DE
INTERESSE CLÍNICO**

Recife
2023

CAIQUE TAVARES DA SILVA

**SISTEMA SENSOR BASEADO EM NANOCOMPÓSITO DE
POLIPIRROL-NANOPARTÍCULAS DE OURO E ÓXIDO DE
GRAFENO APLICADO A DETECÇÃO DE BACTÉRIAS DE
INTERESSE CLÍNICO**

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

Orientador: Cesar Augusto Souza de Andrade

Coorientador: Alberto Galdino da Silva Junior

Recife
2023

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

Silva, Caique Tavares da.

Sistema sensor baseado em nanocompósito de polipirrol-nanopartículas de ouro e óxido de grafeno aplicado a detecção de bactérias de interesse clínico / Caique Tavares da Silva. - Recife, 2023.

62 p. : il., tab.

Orientador(a): Cesar Augusto Souza de Andrade

Coorientador(a): Alberto Galdino da Silva Junior

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Biomedicina, 2023.

1. biossensores. 2. identificação. 3. Gram-negativa. 4. Lt-MAP4. 5. peptídeo antimicrobiano. I. Andrade, Cesar Augusto Souza de . (Orientação). II. Silva Junior, Alberto Galdino da. (Coorientação). IV. Título.

610 CDD (22.ed.)

CAIQUE TAVARES DA SILVA

**SISTEMA SENSOR BASEADO EM NANOCOMPÓSITO DE
POLIPIRROL-NANOPARTÍCULAS DE OURO E ÓXIDO DE
GRAFENO APLICADO A DETECÇÃO DE BACTÉRIAS DE
INTERESSE CLÍNICO**

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

Aprovada em: 29 / 09 / 2023

BANCA EXAMINADORA

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

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

Prof. Ms. Léony Soares de Oliveira
Universidade Federal de Pernambuco / Depto. de Bioquímica

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

Dedico este trabalho ao meu irmão
Diego Tavares e a todos os familiares e
amigos que me apoiaram até aqui. Que
Deus nos permita admirar a cada dia a
beleza da vida.

AGRADECIMENTOS

À Deus primeiramente.

Agradeço ao meu orientador Dr. Prof. César Augusto Souza de Andrade, que fez esse trabalho possível ao ter me colhido dentro do laboratório. Também gostaria de agradecer meu coorientador Dr. Alberto Galdino da Silva Junior, por sempre sanar as minhas dúvidas e ouvir meu desespero com os resultados (kkkk).

Um agradecimento a Dr. Prof.^a Maria Danielly pela realização e condução das atividades do laboratório. Gostaria de expressar minha imensa gratidão a todos do laboratório, por toda ajuda, cooperação e auxílio. Um agradecimento especial a Brenda e Sthefany que me ajudaram em várias etapas e a Léony Soares por ter acompanhado por várias vezes meus experimento até tarde. Agradecer a FACEPE pelo financiamento da bolsa de iniciação científica, a Ludovico Migliolo pelo fornecimento do peptídeo e a Prof.^a Gláucia M.S. Lima pelos microrganismos. Um agradecimento ao departamento de Bioquímica pelos 3 anos e meio, desde a minha primeira experiência como monitor de bioquímica 1.

Gostaria de agradecer a todos aos meus colegas que me acompanharam durante a graduação. Além disso, gostaria de estender meu agradecimento às minhas amigas de jornada acadêmica, Juliana Renata e Michelly Lopes, por estarmos apoiando uns aos outros até hoje. Um agradecimento a minha dupla de trabalho Dryelli Frances, por estar sempre ao meu lado durante todos os momentos.

Quero expressar minha profunda gratidão à minha mãe, Roseilda Tavares, e ao meu padrasto, Jonas Nemesio, por terem possibilitado a oportunidade de estudar em uma universidade federal. Em muitas ocasiões, abriram mão de suas próprias responsabilidades para que eu pudesse estar aqui. Agradeço de coração por todo o amor e carinho que me deram. Em nome do meu tio Hélio, gostaria de expressar minha gratidão a todos os meus familiares que apoiaram a realização desse sonho. Outro agradecimento a Paula Bergantim e a seus pais, Marcílio e Rosângela, por toda orientação, auxílio e incentivo desde o início do curso.

Finalizo agradecendo ao meu irmão Juan Tavares e ao meu falecido irmão Diego Tavares por todas as histórias, brincadeiras e risadas que compartilhamos. Obrigado por fazerem parte da minha vida! Sempre estaremos juntos.

**“Você pode alcançar qualquer coisa através
da aplicação diligente da ciência”
Dr. Stone**

SILVA, Caique Tavares. **Sistema sensor baseado em nanocompósito de polipirrol-nanopartículas de ouro e óxido de grafeno aplicado a detecção de bactérias de interesse clínico**. 2023. 62. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2023.

RESUMO

As infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) são um grave problema socioeconômico, que além de ocasionar elevados custos aos serviços de saúde, aumentam a morbidade e mortalidade de pacientes internados. Os casos de IRAS geralmente são associados ao aumento da resistência bacteriana, causada pelo uso indiscriminado dos antibióticos. Desta forma, um diagnóstico rápido e preciso pode auxiliar na resolução deste problema. Contudo, técnicas convencionalmente empregadas na identificação bacteriana, como testes bioquímicos, ELISA e PCR, são demoradas, caras e complexas. Por essa razão que o desenvolvimento de biossensores apresentam-se como alternativa econômica e versátil à identificação de microrganismos, permitindo respostas sensíveis e específicas a um menor custo e tempo. Os biossensores são caracterizados por empregar componentes biológicos, tais como enzimas, ácidos nucleicos, anticorpos e entre outros, como elementos de biorreconhecimento específico. Os sinais emitidos podem ser amplificados e aprimorados através da incorporação de nanomateriais, como polímeros condutores, nanopartículas, derivados do grafeno, ou até mesmo combinações destes em nanocompósitos para aproveitar suas diversas propriedades. Neste princípio, buscou-se desenvolver um biossensor baseado no nanocompósito de polipirrol-óxido de grafeno-ouro associado ao peptídeo antimicrobiano Lt-MAP4 como biorreceptor para identificação e diferenciação de bactérias de interesse clínico. Além disso, realizou análise do nanocompósito frente as técnicas de espectroscopia UV/visível e espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier, no qual demonstraram a incorporação e constituição dos nanomateriais usados. A caracterização do biossensor foi obtida através da utilização das técnicas eletroquímicas de voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS). Destas, foram obtidas a corrente de pico anódico (i_{pa}) e a resistência à transferência de carga (R_{ct}), respectivamente, para análise da cinética dos elétrons frente as modificações na superfície do eletrodo de ouro. O sistema sensor foi submetido a identificação de bactérias Gram-negativa e Gram-Positivas em suspensão salina nas concentrações de 10^1 a 10^6 unidade formadora de colônia por mL (UFC mL⁻¹). Os dados voltamétricos e impedimétricos revelaram que o peptídeo Lt-MAP4 apresenta uma maior afinidade por bactérias Gram-negativas, devido à carga negativa da parede bacteriana rica em lipopolissacarídeos aniônicos. Essa observação foi confirmada quantitativamente através dos valores de i_{pa} e R_{ct} ao longo das concentrações utilizadas. Desta forma, o sistema sensor desenvolvido mostra-se promissor, frente as técnicas convencionais, na identificação de bactérias.

Palavras-chave: biossensores. identificação. Gram-negativa. Lt-MAP4. peptídeo antimicrobiano.

SILVA, Caique Tavares. **Sensor System based on nanocomposite polypyrrole-gold nanoparticles and graphene oxide applied to the detection of bacteria of clinical interest.** 2023. 62. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2023.

ABSTRACT

Healthcare-associated infections (HAIs) are a serious socioeconomic problem, which in addition to causing high costs for healthcare services, increases the morbidity and mortality of hospitalized patients. HAI cases are generally associated with increased bacterial resistance, caused by the indiscriminate use of antibiotics. Therefore, a quick and accurate diagnosis can help resolve this problem. However, techniques conventionally used in bacterial identification, such as biochemical tests, ELISA and PCR, are time-consuming, expensive and complex. For this reason, the development of biosensors presents an economical and versatile alternative to the identification of microorganisms, allowing sensitive and specific responses at a lower cost and time. Biosensors are characterized by employing biological components, such as enzymes, nucleic acids, antibodies and others, as elements of specific biorecognition. The emitted signals can be amplified and improved through the incorporation of nanomaterials, such as conductive polymers, nanoparticles, graphene derivatives, or even combinations of these in nanocomposites to take advantage of their diverse properties. In this principle, we sought to develop a biosensor based on the polypyrrole-graphene oxide-gold nanocomposite associated with the antimicrobial peptide Lt-MAP4 as a bioreceptor for identifying and differentiating bacteria of clinical interest. Furthermore, the nanocomposite was analyzed using UV/visible spectroscopy and Fourier transform infrared spectroscopy, which demonstrated the incorporation and constitution of the nanomaterials used. The characterization of the biosensor was obtained using the electrochemical techniques of cyclic voltammetry (VC) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS). From these, the anodic peak current (i_{pa}) and the charge transfer resistance (R_{CT}) were obtained, respectively, to analyze the kinetics of the electrons in the face of modifications on the surface of the gold electrode. The sensor system was subjected to identification of Gram-negative and Gram-Positive bacteria in saline suspension at concentrations of 10^1 to 10^6 colony-forming units per mL (CFU mL⁻¹). Voltammetric and impedimetric data revealed that the Lt-MAP4 peptide has a greater affinity for Gram-negative bacteria, due to the negative charge of the bacterial wall rich in anionic lipopolysaccharides. This observation was confirmed quantitatively through the i_{pa} and R_{CT} values across the concentrations used. In this way, the sensor system developed shows promise, compared to conventional techniques, in identifying bacteria.

Key words: biosensors. identification. Gram-negative. Lt-MAP4. antimicrobial peptide.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Principais sítios anatômicos acometidos por IRAS em UTI.....	17
Figura 2. Mecanismos de resistência encontrados em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.....	20
Figura 3. Estrutura e composição de um biossensor, no qual temos o biorreceptor seletivo, o transdutor de sinal e o detector	26
Figura 4. Célula eletroquímica (a) e eletrodo comercial (b) compostos pelo eletrodo de trabalho (ET), eletrodo de referência (ER) e contra-eletrodo (CE) na detecção eletroquímica.....	31
Figura 5. Demonstração do gráfico de Nyquist (a) frente aos elementos do circuito equivalente de Randles (b).....	32
Figura 6. Voltamograma cíclico mostrando uma reação reversível	33
Figura 7. Síntese do nanocompósito	38
Figura 8. Montagem do sistema sensor Cys-PPy-AuNPs-GO-Lt-MAP4	41
Figura 9. Caracterização do nanocompósito pelas técnicas de UV-vis (a) e FTIR (b)	42
Figura 10. Voltamograma cíclico (a) e diagrama de Nyquist (b) referentes a montagem da plataforma.	43
Figura 11. Análise voltamétrica (a; c ; e) e impedimétrica (b; d; f) do biossensor frente as concentrações bacterianas.....	44
Figura 12. Circuito equivalente de Randles utilizado no ajuste dos dados impedimétricos.	46
Figura 13. Curva de calibração obtida usando os valores de $\Delta RCT\%$	47
Figura 14. $\Delta RCT\%$ após exposição a diferentes espécies de bactérias.	48
Figura 15. Recobrimento da camada sensora (θ) após reconhecimento bacteriano (10^1 - 10^5 UFC mL ⁻¹).....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Custo de ocupação diária de paciente com / sem IRAS.	18
Tabela 2. Principais microrganismos causadores de IRAS em UTIs brasileiras entre o período de 2000 a 2016.	19
Tabela 3. Recomendação de novos antibióticos segundo a OMS.....	21
Tabela 4. Variação da corrente anódica (ΔI) após interação com as bactérias (10^1 - 10^5 UFC mL ⁻¹).	45
Tabela 5. Valores dos elementos do circuito equivalente de Randles após exposição a distintas concentrações bacterianas (10^1 - 10^5 UFC mL ⁻¹).....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AMP	do inglês Antimicrobial Peptide
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AuNPs	Nanopartículas de ouro
BGE	Eletrodo de barra de ouro
BNDES	Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social
CPE	Elemento de fase constante
cys	do inglês Cysteamine
EDC	N-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida
EIS	Espectroscopia de impedância eletroquímica
ELISA	do inglês Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FTIR	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier
GO	Óxido de grafeno
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ipa	Correntes de pico anódicas (ipa)
IRAS	Infecções relacionadas à assistência à saúde
MOMR	Microrganismos multirresistentes
MOR	Microrganismos resistentes
NHS	N-hidroxisuccinimida
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PPy	Polipirrol
R _{CT}	Resistência à transferência de carga
SAM	Monocamada aultomontada
UFC mL ⁻¹	Unidades formadoras de colônia por mL
UTI	Unidade de tratamento intensiva
UV-vis	Espectroscopia UV/visível
VC	Voltametria cíclica
ΔI	Variação da corrente anódica
ΔRCT	Variação da resistência à transferência de cargas
Θ	Recobrimento da camada sensora

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1	Infecções relacionadas à assistência à saúde – IRAS.....	16
2.1.1	IRAS no Brasil	17
2.1.2	Resistência aos antibióticos	19
2.2	Técnicas convencionais de diagnóstico microbiológico	21
2.2.1	Microscopia	22
2.2.2	Coloração de GRAM.....	22
2.2.3	Crescimento em meio de cultura	23
2.2.4	Testes bioquímicos.....	23
2.3	Técnicas Inovadoras	24
2.3.1	Imunoensaios	24
2.3.2	Biologia molecular	25
2.4	Biossensores.....	26
2.4.1	Tipos de biossensores.....	27
2.4.2	De acordo com o seu biorreceptor.....	27
2.4.2.1	Genossensor.....	27
2.4.2.2	Microbiológicos	27
2.4.2.3	Imunossensor.....	28
2.4.2.4	Enzimático.....	28
2.4.3	Segundo ao evento de biorreconhecimento	29
2.4.3.1	Dispositivos de bioafinidade.....	29
2.4.3.2	Dispositivos biocatalíticos	29
2.4.4	De Acordo com o Transdutor.....	29
2.4.4.1	Biossensor eletroquímico	29
2.4.4.2	Biossensor óptico.....	30
2.4.4.3	Biossensor piezoelétrico	30
2.4.4.4	Biossensor Térmico	30
2.4.5	Técnicas eletroquímicas	30
2.4.6	Espectroscopia de Impedância eletroquímica (EIS)	31
2.4.7	Voltametria Cíclica (VC)	33
2.5	Peptídeos Antimicrobianos – AMPs	34
2.6	Nonomateriais	35
3	OBJETIVOS.....	37

3.1	Objetivo Geral	37
3.2	Objetivos Específicos	37
4	METODOLOGIA	38
4.1	Materiais.....	38
4.2	Síntese do nanocompósito de polipirrol-óxido de grafeno-ouro	38
4.3	Modificação da superfície do eletrodo.....	39
4.4	Medições eletroquímicas.....	39
4.5	Medidas UV-VIS.....	40
4.6	Medições no FTIR.....	40
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1	Sensor PPy-AuNPs-GO-Lt-MAP4	41
5.2	Análise UV-vis e FTIR do nanocompósito.....	41
5.3	Caracterização eletroquímica da plataforma biossensora.....	42
5.4	Performance analítica do biossensor	44
6	CONCLUSÃO	50
	REFERÊNCIAS.....	51

1 INTRODUÇÃO

As infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS), como o nome sugere, são eventos adversos a intervenção hospitalar. A prevenção de tais infecções consistem em um desafio global aos sistemas de saúde (Lemiech-Mirowska et al., 2021). Além comprometer diretamente a saúde do paciente, aumentando a morbidade e mortalidade, impacta em custos adicionais aos serviços de saúde, onde no Brasil estima-se ser 55% maior em pacientes com IRAS (Agência Nacional De Vigilância Sanitária, 2021). Segundo o relatório liberado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), a cada 100 pacientes em tratamento intensivo 15 serão acometidos por IRAS se de países subdesenvolvidos, e sete se forem de países desenvolvidos (OMS, 2022).

Casos de sepse e IRAS estão associados ao aumento da resistência bacteriana, favorecida pelo uso indiscriminado de antibióticos, alertando a utilização de terapias efetivas que dificultem a indução de resistência (Bassetti et al., 2022; Wattal et al., 2020). De acordo com o relatório da *Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System* (GLASS), índices elevados de resistência bacteriana foram verificados em bactérias causadoras de sepse hospitalar, bem como, maior resistência aos tratamentos de primeira linha nas infecções mais frequentes por *Escherichia coli* (OMS, 2022). Estima-se que 700 mil mortes anuais sejam ocasionadas por microrganismos resistentes a antibióticos, impactando em um montante estimado de US\$ 100 trilhões em custos até 2050, comparável a crise econômica de 2008 (MAJUMDER et al., 2020; THE WORLD BANK, 2016). Desta forma, técnicas diagnósticas rápidas e de baixo custo reduziriam a incerteza terapêutica, direcionando a antibioticoterapia, além de dar segmento ao paciente.

As técnicas tradicionalmente empregadas na bacteriologia, como a microscopia, o cultivo em Ágar e os testes bioquímicos, apesar de bem consolidadas enfrentam limitações. A falta de especificidade da microscopia e o tempo para crescimento nos meios de cultivos, dificultam as intervenções médicas imediatas. Além disso, técnicas imunoenzimáticas como ELISA e moleculares como a PCR em tempo real (qPCR) exigem equipamentos caros, reagentes, profissionais capacitados e processamento prévio das amostras (Hoyos-Nogués et al., 2018). Em virtude disso, o desenvolvimento de biossensores se mostrou uma alternativa eficiente, econômica

e versátil na investigação de microrganismos (Silva Junior et al., 2022; Liang et al., 2022).

Um biossensor é constituído por três elementos: receptor biológico, que pode ser enzimático, proteico, imunológico ou mesmo nuclear, capaz de reconhecer um elemento alvo específico; transdutor, que traduz de maneira mensurável os sinais liberados da interação receptor biológico-alvo; detector, que processa as informações antes apresentá-las (Bhalla et al., 2016; Leva-Bueno et al. 2020). Os transdutores classificados como eletroquímicos, por converter a energia química do biorreconhecimento em energia elétrica, mostraram-se mais empregados no biossensoriamento de patógenos do que transdutores ópticos e mecânicos. Isso decorre por terem menores custos, respostas rápidas, boa sensibilidade e especificidade, além de permitir plataformas compactas e portáteis (Cesewski et al., 2020). Adicionalmente, o uso de nanomateriais como polímeros condutores, nanopartículas, derivados do grafeno, ou mesmo a combinação desses elementos em nanocompósitos, possibilita a amplificação e refinamento dos sinais gerados no processo de biorreconhecimento.

Peptídeos antimicrobianos (AMPs) são oligopeptídeos pertencentes ao sistema imune inato de vários organismos vivos. São caracterizados por sua especificidade, especialmente na defesa contra microrganismos patogênicos (como bactérias, vírus e fungos), além de que alguns demonstrarem atividade anti-tumoral (Lazzaro et al., 2020). A laticina-3a (Ltc-3a), obtido do veneno da *Lachesana tarabaei*, foi utilizada como molde para produzir uma geração de AMPs sintéticos, nomeados como Lt-MAPs. Os análogos Lt-MAP1, Lt-MAP2 e Lt-MAP3 demonstraram atividades antimicrobiana, anti-biofilme e antitumoral, em maior ou menor grau que o peptídeo parental (Ltc-3a) (Moraes et al., 2022). O peptídeo Lt-MAP4 (AKKLAKYLKKA) foi desenhado com base no análogo Lt-MAP3 (LAKKLAKYLKKAL) por meio da deleção dos resíduos de Leu1 e Leu13 nas extremidades da cadeia.

O presente estudo busca desenvolver uma plataforma bioeletroquímica baseada no nanocompósito de PPy-AuNPs-GO associando ao peptídeo Lt-MAP4 como mecanismo de reconhecimento bacteriano. Avaliando o sistema através das técnicas eletroquímicas de voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS). Espera-se que a plataforma identifique e diferencie as amostras bacterianas de interesse médico ao longo das concentrações empregadas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 INFECÇÕES RELACIONADAS À ASSISTÊNCIA À SAÚDE – IRAS

As infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) compreendem qualquer infecção resultante a prestação de serviços de atenção à saúde. Antigamente referida como infecção hospitalar, teve seu termo ampliado para englobar outros locais que também realizam cuidado e assistência à saúde. Deste modo, as IRAS não se restringem aos hospitais, mas a qualquer local que realize procedimentos ambulatoriais, tais como asilos, clínicas de hemodiálise, instituições de longa permanência e clínicas odontológicas (Silva; Padoveze, 2011). Contudo, a maior parte das IRAS intercorrem nas unidades de terapia intensiva (UTIs), que prolonga a permanência destes pacientes, cominando no aumento da mortalidade e das despesas hospitalares. Estima-se que 17% a 51,4% dos pacientes hospitalizados nas UTIs poderão adquirir uma IRAS ao longo da sua estadia. Portanto, deve-se avaliar os riscos potenciais de infecção ao admitir o paciente nas UTIs a fim de garantir qualidade de vida e minimizar os impactos associado as IRAS (Zhang et al., 2019)

As IRAS constituem um grave problema socioeconômico. Estima-se que por ano 1,7 milhão de pacientes adquiriam IRAS nos Estados Unidos, nos quais 100 mil evoluem ao óbito. Isso reflete diretamente na economia, gerando um gasto anual aproximado de 30 bilhões de dólares (Leoncio et al., 2019). Na União Europeia não é diferente, com aproximadamente 4 milhões pessoas diagnosticadas e 37 mil óbitos relacionados, as IRAS continuam sendo uma das principais causas de custos nas UTIs (Silva et al., 2022). No entanto, a escassez de recursos, a falta de estudos epidemiológicos e a falta de fiscalização, entre outros fatores, contribuem para que as IRAS sejam significativamente mais comuns em países em desenvolvimento (Leal et al., 2021). Apesar da compreensão limitada despeito do ônus econômico, especialmente nos países subdesenvolvidos, estima-se que os custos diretos e indiretos associados as IRAS como perda de produtividade devido à morbidade e mortalidade, girem entorno dos vários milhões de dólares (ali et al., 2018; Storr et al., 2017).

Ainda que seja complexa a delimitação, fatores como a idade, presença de comorbidades, realização de procedimentos cirúrgicos e uso de dispositivos invasivos são aspectos favoráveis ao desenvolvimento das IRAS. Segundo levantamento

epidemiológico feito nos Estados Unidos, 6% dos pacientes traumatizados são afetados por infecções durante seu tratamento devido a dispositivos invasivos e cirurgias extensas (Hessels et al., 2020). Segundo Reghu et al. (2014), as infecções mais comuns incluem as infecções do trato urinário, infecções em feridas cirúrgicas, pneumonia e infecções na corrente sanguínea (Figura 1). Ainda de acordo com Reghu et al. (2014), 80% das infecções urinárias são atribuíveis ao cateter uretral permanente, enquanto a infecção de ferida cirúrgica se associa a contaminação bacteriana direta no sítio cirúrgico, que difere da pneumonia nosocomial ligada a ventilação mecânica e da infecção da corrente sanguínea associado ao cateterismo vascular, por estarem associado a contaminação do dispositivo. Na análise de prevalência conduzida nos EUA, as infecções gastrointestinais causadas por *Clostridioides difficile* ficaram em segundo lugar entre as infecções relacionadas aos cuidados de saúde, perdendo apenas para a pneumonia (Magill et al., 2018). Por outro lado, em nações em desenvolvimento, as infecções do sítio cirúrgico ocupam a posição principal entre os casos de infecções hospitalares, com uma incidência significativamente maior do que em países desenvolvidos (Allegranzi et al., 2011).

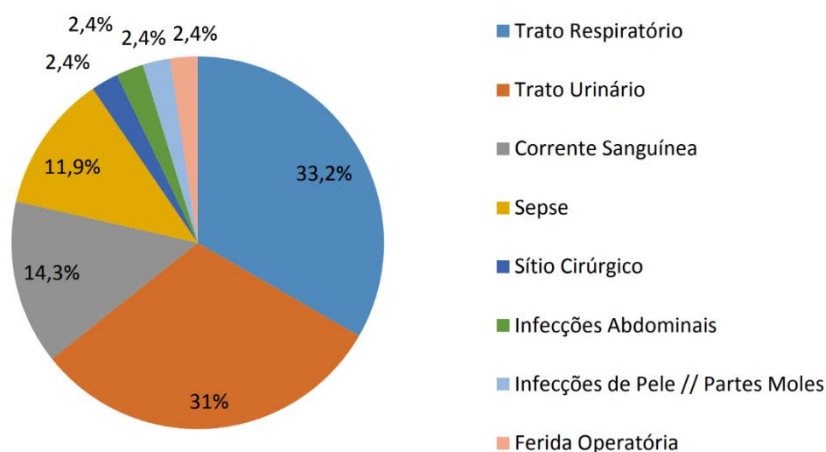


Figura 1. Principais sítios anatómicos acometidos por IRAS em UTI. Fonte: Retirado de Costa et al., 2019

2.1.1 IRAS no Brasil

A portaria nº 2.616 do Ministério da Saúde do Brasil caracteriza as IRAS como qualquer intercorrência que ocorra após 72 horas a sua admissão do paciente, ou anteriormente, desde que estejam diretamente associadas ao cuidado de saúde fornecido (Lopes Araújo et al., 2018). No Brasil, a taxa de incidência das infecções

nosocomiais corresponde a 22,8%, o que representa mais que o dobro em comparação com nações europeias desenvolvidas (Gomes et al., 2020). Isso tem um impacto direto nos serviços de saúde tanto públicos quanto privados, resultando em um aumento no consumo de recursos devido ao período de internação prolongado. Um levantamento nacional apontou um paciente com IRAS causa uma despesa de US\$ 262,72/dia a mais do que aqueles sem esse tipo de infecção (Tabela 1). Os gastos equivalem a 18% do custo diário total, associados a permanência destes pacientes (Kiffer et al., 2015).

Tabela 1. Custo de ocupação diária de paciente com / sem IRAS.

	CUSTO MÉDIO (US\$)	INTERVALO DE CONFIANÇA	CERTEZA
Total de pacientes internados c/ IRAS	US\$ 25.075,53	US\$ 11.455,18 – US\$ 53.998,43	90%
Total de pacientes internados sem IRAS	US\$ 113.147,57	US\$ 54.698,44 – US\$ 214.340,06	95%
Por paciente internado c/ IRAS	US\$ 737,13	US\$ 318,29 – US\$ 4.125,97	85%
Por paciente internado sem IRAS	US\$ 474,35	US\$ 215,76 – US\$ 857,88	95%

Fonte: Retirado de Kiffer et al., 2015.

Dentre os microrganismos predominantes nas infecções nosocomial (Tabela 2), destacam-se as bactérias Gram-negativas, que representou 71,05% dos casos isolados nas UTIs na cidade de Natal, sendo o *Acinetobacter sp.* o tipo mais encontrado (Lopes Araújo et al., 2018). Contudo, nas infecções por ponta de cateter, o *Staphylococcus spp.* foi gênero mais frequentemente identificado, atribuído à sua considerável resistência ambiental, que possibilita contaminar superfícies por longos períodos de tempo (Gomes et al., 2020). Esses dados correlacionam-se com a resistência antimicrobiana, onde o *Acinetobacter spp.* resistentes aos carbapenêmicos lidera com uma prevalência de 77,7% dos isolados, seguido pelo *Staphylococcus coagulase negativo* resistente à oxacilina, com 72,2%. A pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV) foi a categorias de infecções mais prevalente nas UTIs, registrando em 11,50%, superando as infecções do trato urinário e as infecções na corrente sanguínea, que representaram 4,70% e 4,40% respectivamente (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2017).

Desde 1999, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) assumiu a responsabilidade de monitorar as IRAS no país, coordenando as diversas instâncias de controle dessas infecções. Buscando atender os objetivos estabelecidos pela OMS, a Anvisa criou em 2013 o Programa Nacional de Prevenção e Controle de

Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (PNPCIRAS). O PNPCIRAS em sua terceira versão, com vigência de 2021-2025, tem como objetivos incentivar os programas de prevenção e controle das IRAS, aprimorando o Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica, com intuito de reduzir a incidência das principais IRAS e prevenir a disseminação de microrganismos multirresistentes (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2021). No entanto, há obstáculos a serem enfrentados, incluindo as dificuldades enfrentadas pelos hospitais de menor porte em estabelecer Comissões de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH), além das questões relacionadas à abrangência e fiscalização das instituições de saúde em todo o extenso território (Padoveze; Fortaleza, 2014).

Tabela 2. Principais microrganismos causadores de IRAS em UTIs brasileiras entre o período de 2000 a 2016.

MICROORGANISMOS	N	%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10	23,8
<i>Staphylococcus aureus</i>	6	14,3
<i>Acinetobacter baumannii</i>	6	14,3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5	11,7
<i>Acinetobacter sp</i>	4	9,5
<i>Pseudomonas spp</i>	2	4,8
<i>Klebsiella spp</i>	2	4,8
<i>Staphylococcus spp</i>	1	2,4
<i>Staphylococcus coagulase negativa</i>	1	2,4
<i>Proteus mirabilis</i>	1	2,4
MRSA (<i>Staphylococcus aureus</i> Metilina Resistente)	1	2,4
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	2,4
<i>Citrobacter koseri</i>	1	2,4
BGN (Bacilos Gram Negativos Não Fermentadores)	1	2,4
Total	42	100

Fonte: retirado de Costa et al., 2019.

2.1.2 Resistência aos antibióticos

A resistência antimicrobiana (RAM), caracterizada pela ausência ou baixa sensibilidade aos antibióticos preconizados, constitui uma das grandes preocupações no mundo moderno (Figura 2). As infecções causadas por microrganismos resistentes (MOR) ou multirresistentes (MOMR) trazem sérios impactos aos sistemas de saúde,

aumentando morbidade e mortalidade, resultando em prejuízos com uso de antibióticos de última geração (Maia et al., 2021). A prescrição frequente e, por vezes, inadequada de antibióticos contribui para a seleção de MOR, que representam uma das principais origens das IRAS em UTIs (Morosini et al., 2018). Estima-se que nos Estados Unidos haja quase dois milhões de casos de infecções causadas por MOMR, resultando em mais de 23 mil mortes, o que acarreta um gasto anual de aproximadamente 20 bilhões de dólares (Leoncio et al., 2019). Diante do constante aumento da resistência, o futuro mostra-se alarmante, onde prevê que até 2050 cerca de 10 milhões de mortes anuais serão atribuídas às MOMR (Maia et al., 2021).

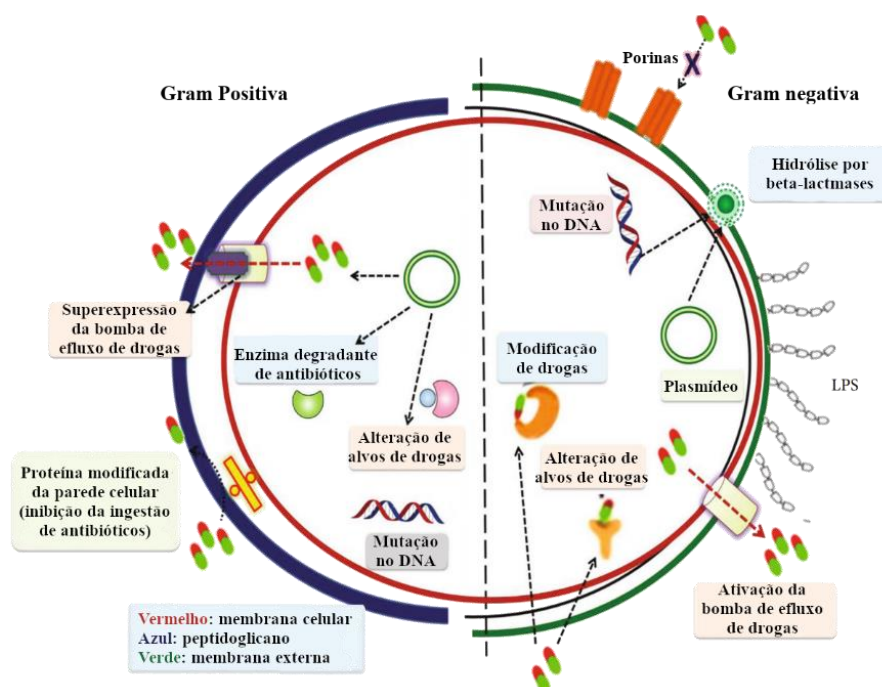


Figura 2. Mecanismos de resistência encontrados em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Fonte: Modificado de Bharadwaj et al., 2022.

No ano de 2015, o Centro Europeu de Prevenção e Controle de Doenças (ECDC) constatou que 39% das infecções, entre os Estados-membros da União Europeia e do Espaço Econômico Europeu, eram ocasionadas por bactérias resistentes a antibióticos de última geração (Cassini et al., 2019). Entre esses MOMR, destaca-se o grupo nomeado como ESKAPE, que reúne as principais espécies resistentes as classes de antibióticos utilizadas atualmente. O termo ESKAPE, inicialmente apresentado por Rice, inclui o *Enterococcus faecium* resistente à vancomicina, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, *Klebsiella pneumoniae* multirresistente, *Acinetobacter baumannii* multirresistente, *Pseudomonas aeruginosa*

resistente a fluoroquinolonas e o *Enterobacter spp.* multirresistente (Denissen et al., 2022; Morosini; Cantón, 2018). Diante do aumento constante do perfil de resistência antimicrobiana aos antibióticos mais avançados, a OMS recomenda o desenvolvimento de novos medicamentos e opções de tratamento alternativas que sejam eficazes contra os MOMRs (Bharadwaj et al., 2022).

Tabela 3. Recomendação de novos antibióticos segundo a OMS.

CLASSIFICAÇÃO DA OMS DE “PATÓGENOS PRIORITÁRIOS” PARA OS QUAIS SÃO URGENTEMENTE NECESSÁRIOS NOVOS ANTIBIÓTICOS	
PRIORIDADE	CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DE RESISTÊNCIA
Crítico	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Carbapenems	Carbapenêmicos
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Carbapenêmicos
<i>Enterobacteriaceae</i> multirresistentes	Carbapenêmicos e 3º. gen. cefalosporinas
Alto	
<i>Staphylococcus aureus</i>	Meticilina, vancomicina intermediária
<i>Enterococcus faecium</i>	Vancomicina
<i>Helicobacter pylori</i>	Claritromicina
<i>Campylobacter spp.</i>	Fluoroquinolonas
<i>Salmonella enterica</i>	Fluoroquinolonas
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	3º. gen. cefalosporinas, fluoroquinolonas
Médio	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Penicilina
<i>Haemophilus influenzae</i>	Ampicilina
<i>Shigella spp.</i>	Fluoroquinolonas

Fonte: Modificado de Morosini et al., 2018.

2.2 TÉCNICAS CONVENCIONAIS DE DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

Diferentes técnicas microbiológicas podem ser aplicadas no reconhecimento bacteriano. Tipicamente, a microscopia é empregada na triagem inicial, especialmente para distinguir entre Gram-negativos e Gram-positivos, enquanto meios de cultura e testes bioquímicos são subsequentemente utilizados para realizar a identificação final do microrganismo.

2.2.1 Microscopia

Na microbiologia, microscopia óptica constitui uma das técnicas mais básicas na descrição e identificação microrganismos. Inicialmente conduzido por Van Leeuwenhoek no século XVII, a microscopia trouxe grandes contribuições científicas. Entre os trabalhos, destaca-se a contribuição de Hans Christian Joachim Gram que permitiu separar as bactérias em dois grandes grupos segundo a sua afinidade aos corantes utilizados (Mohamad et al., 2014; Rohde, 2011). Hans C.J. Gram observou que algumas bactérias permanecia coradas em violeta, mesmo após utilizado o descorante, definidas como Gram positivas, enquanto outras adquiram a cor do corante de fundo, classificando-as como Gram negativas. A microscopia óptica permitiu classificar as bactérias segundo a sua forma, tamanho, arranjo e coloração (Rohde, 2011). As características morfológica das bactérias permitem, deste modo, ter uma identificação presuntiva do agente microbiano. Contudo, há limitações na visualização de certas estruturas devido ao pequeno diâmetro, como os flagelos, necessitando assim de técnicas adicionais para sua observação, além de serem inespecíficas (Mohamad et al., 2014).

2.2.2 Coloração de GRAM

A coloração de Gram, conforme o trabalho de Hans C.J. Gram, classificar as bactérias em Gram-positivos e Gram-negativos segundo a permeabilidade da parede bacteriana ao corante cristal violeta (Mohamad et al., 2014). Essa característica deve-se a composição da parede bacteriana, na qual paredes ricas em peptidoglicano dificultam que o corante primário cristal violeta seja removido. Por outro lado, paredes constituídas predominantemente por ácidos graxos, como lipopolissacarídeos e lipoproteínas, são facilmente descoradas pela ação de um descorante. O processo de coloração de Gram inicia-se com a coloração das células bacterianas com o cristal violeta, depois de serem previamente fixadas a lâmina. Em seguida, o lugol é adicionado para fixar o corante primário as estruturas celulares, ao formar o complexo iodo-pararosanilina. Após essa etapa, a lâmina é submetida a uma descoloração com álcool etílico (99,5%), seguido pela aplicação de um segundo corante, a safranina como corante de fundo. Entre cada passo, o excesso é cuidadosamente eliminado através de um fio de água corrente. Após secagem, a lâmina está pronta para ser

observada no microscópio (Martins et al., 2001). Contudo, algumas bactérias não se coram naturalmente, além que cepas muito velhas de Gram-positivas podem ser mal interpretadas como Gram-negativas, demonstrando a imprecisão da técnica.

2.2.3 Crescimento em meio de cultura

O avanço da microbiologia alcançado no século XIX só foi possível com a descoberta dos meios de cultura. O microbiologista francês Louis Pasteur, além de desconstruir a geração espontânea, foi responsável por criar o primeiro meio de cultura. Anos mais tarde, Robert Koch criou um meio cultura sólido baseado em Agar, o qual é utilizado até hoje, possibilitando assim o isolamento e obtenção de culturas puras (Bonnet et al., 2020). As características morfológicas, como cor, tamanho e aspecto das colônias, podem fornecer indícios do tipo ou gênero bacteriano cultivado. No entanto, em muitos casos, substratos cromogênicos ou fluorogênicos são utilizados para destacar reações enzimáticas específicas das bactérias de interesse. Deste modo, resultando na formação de cores ou à emissão de fluorescência quando há crescimento com a atividade enzimática correspondente (Franco-Duarte et al., 2019).

Outra abordagem é o emprego de meios seletivos no isolamento de espécies ou gêneros bacterianos desejados, utilizando-se de inibidores para eliminar a flora microbiana indesejada. Geralmente, o meio seletivo é composto por um meio base ao qual são adicionados antibióticos, corantes, sais ou até mesmo outros microrganismos que atuem nesta seletividade (Bonnet et al., 2020). No entanto, uma das principais desvantagens continua sendo o tempo de incubação requerido para o crescimento, que pode variar de 16 a 48 horas. Apesar de sugestivos, esses meios não são completamente específicos, demandando a confirmação através de outras técnicas, o que por sua vez estende o tempo necessário para a identificação (Váradi et al., 2017).

2.2.4 Testes bioquímicos

As espécies bacterianas exibem atividades bioquímicas distintas, principalmente aquelas relacionadas ao metabolismo, o que permite diferenciá-las segundo a sua expressão (Al-Joda et al., 2021; Shoaib et al., 2020). As provas

bioquímicas constituem um dos principais métodos de identificação na microbiologia (Zhou et al., 2015). Dentre as principais provas, destacam-se os testes de catalase, coagulase e redução de nitrato na identificação de bactérias Gram-positivas, enquanto os testes de oxidase, urease, indol e vermelho de metila são mais aplicados nas bactérias Gram-negativas (Al-Joda et al., 2021; Shoaib et al., 2020).

Contudo, a bioquímica convencional mostrasse bastante demorada, podendo variar entre algumas horas a vários dias. Assim, a utilização de testes bioquímicos em sistemas automatizados mostra-se mais vantajoso ao permitir a identificação em poucas horas. No entanto, inconsistências podem ser ocasionadas por tais aparelhos. Isso foi constatado durante a avaliação do sistema automatizado VITEK®-2, o qual, em comparação com os testes bioquímicos convencionais, revelou uma taxa de discordância de 20,83% (Ravea et al., 2019).

Métodos fenotípicos, como os testes bioquímicos, possuem limitações devido à capacidade dos microrganismos de alterar suas características. Fatores ambientais, como as condições de crescimento, podem ocasionar estresse fisiológico que afeta o crescimento. Além disso, mutações genéticas podem levar à expressão de outros fenótipos (NG; OV, 2016).

2.3 TÉCNICAS INOVADORAS

2.3.1 Imunoensaios

Os imunoensaios ganharam grande espaço na medicina moderna ao permitir detectar e quantificar antígenos e anticorpos. O princípio das técnicas em si são similares, uma vez que exploram a interação específica entre antígenos e anticorpos (Wang et al., 2022). Algumas destas técnicas utilizam marcadores fluorescentes ou quimioluminescentes conjugados aos anticorpos para amplificação do sinal, facilitando a visualização ou a detecção por instrumentos (Bender; Mühlen, 2008). Dentre as principais técnicas de imunoensaio empregadas no diagnóstico microbiológico, destaca-se a imunocromatografia, a imunofluorescência e o ELISA (Perantoni et al., 2019). O ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), em especial, tem sido empregado na detecção de várias bactérias de importância clínica e alimentar (Guo et al., 2018; Jackson et al., 2019). Variações da técnica, como o ELISA em papel, possibilitam a redução de custos com equipamentos e reagentes, bem

como, diminuir os danos ambientais com resíduos, tornando-a mais viável na detecção de patógenos bacterianos (Pang et al., 2018). Contudo, apesar do ELISA facilitar a análise de vários microrganismos em amostras biológicas, as técnicas de imunoensaio são menos sensíveis. Além disso, demandam de etapas complexas de processamento, que por muitas vezes necessitam de invenção humana (Chen et al., 2021; Perantoni et al., 2019; Wang et al., 2022).

2.3.2 Biologia molecular

Desenvolvida no século XX, a biologia molecular revolucionou diversas áreas de pesquisa, incluindo a identificação de microrganismos. Além de exigirem quantidades mínimas de material genético, as técnicas de biologia molecular possibilitam a análise da resistência antimicrobiana e a determinação de relações filogenéticas (Church et al., 2020; Peranton et al., 2019). Dentre as principais técnicas, destacam-se aquelas baseadas na hibridização, amplificação ou sequenciamento do material genético (Váradi et al., 2017). A metodologia de amplificação de ácidos nucleicos são uma das mais aplicadas no diagnóstico de doenças infecciosas. Neste procedimento, inicialmente realiza-se a extração do material genético do patógeno, no qual o alvo é processado e purificado antes de ser realmente amplificado para identificação. Com diversas variações, a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) continua sendo a metodologia de amplificação mais empregada (Leeuwen, 2009).

Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR) apresenta alta sensibilidade e especificidade, permitindo monitorar e quantificar os produtos gerados na amplificação (Perantoni et al., 2019; Sonawane et al., 2013). Isso deve-se ao uso de sondas fluorescentes que associado a análise computacional gera respostas rápidas e precisas. Diferindo daqueles baseado de eletroforese em gel de agarose. No entanto, as técnicas de amplificação apresentam limitações intrínsecas, como incapacidade de identificar múltiplos patógenos simultaneamente, o risco de contaminações cruzadas (falsos-positivos) ou mesmo a ação de inibidores (falsos-negativos)(Leeuwen, 2009; Perantoni et al., 2019; Váradi et al., 2017). Além disso, apresentam alto custo com equipamentos e reagentes, necessidade de profissionais especializados e ambiente devidamente controlado.

2.4 BIOSSENSORES

Os biossensores são dispositivos analíticos altamente seletivos que permitem respostas quantitativas e qualitativas de inúmeras amostras (Park, 2020). O termo "biossensores", originalmente proposto por Clark e Lyons em 1962, refere-se a qualquer dispositivo que utilize de elementos biológicos, como proteínas, enzimas, ácido nucleicos e anticorpos, no reconhecimento de alvos específico através dos sinais físico-químicos liberados (Castillo-Henríquez et al., 2020; Ramesh et al., 2023). Deste modo, a estrutura básica de um biossensor, constitui-se por um "biorreceptor" que realizará o reconhecimento do alvo, um transdutor físico-químico que traduzirá o biorreconhecimento de maneira a ser compreendida pelo detector (Figura 3) (Kim et al., 2019).

Os biossensores têm despertado grande interesse devido à sua notável especificidade e sensibilidade, sendo vistos como alternativas às técnicas analíticas tradicionais. Essa evolução impulsionou a utilização de biossensores em diversos setores, incluindo a saúde, a indústria alimentícia e a preservação ambiental, devido à capacidade de identificar rapidamente e com precisão substâncias como drogas, toxinas alimentares, produtos químicos e microrganismos patogênicos. No entanto, muitas pesquisas se concentram em sua aplicação como potenciais ferramentas de diagnóstico. Esse desenvolvimento envolve um trabalho multidisciplinar, integrando conhecimentos de diversas áreas, como química, física, biologia, engenharia e nanotecnologia (Carpenter et al., 2018; Chircov et al., 2020).

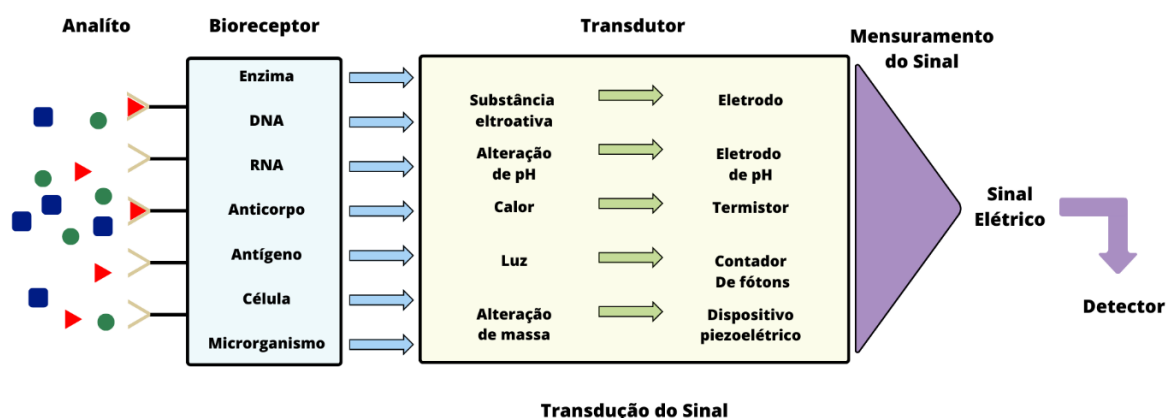


Figura 3. Estrutura e composição de um biossensor, no qual temos o biorreceptor seletivo, o transdutor de sinal e o detector. Fonte: Modificado de ARYA et al., 2012.

2.4.1 Tipos de biossensores

De acordo com seus elementos, os biossensores podem ser classificados: segundo ao tipo de biorreceptor utilizado, segundo o transdutor empregado na conversão do sinal ou mesmo de acordo com o modo de reconhecimento. Apesar da divisão didática, diferentes arquiteturas de biossensoriamento podem ser incorporadas, empregando elementos distintos na obtenção de respostas mais precisas e específicas.

2.4.2 De acordo com o seu biorreceptor

A escolha do biorreceptor é um passo crucial na construção de um biossensor, no qual deve-se pensar nas características do analito alvo, no tipo de resposta que se deseja obter e nas possíveis desvantagens. Os biossensores podem ser categorizados de acordo com o tipo de biomolécula utilizada, seja uma enzima, um nucleotídeo, um anticorpo, ou ainda pelo uso de microrganismos completos.

2.4.2.1 Genossensor

Genossensores são empregados no reconhecimento de sequências específicas de material genético através do uso de ácidos nucleicos. Sondas de nucleotídeos, ou mesmo agentes intercalantes, realizam o anelamento específico com os pares de base complementares na fita alvo. Isso possibilita uma maior seletividade no reconhecimento, resultando em sistemas altamente específicos para a identificação de patógenos, contaminações ou ainda mutações genéticas (Garcia-Melo et al., 2022).

2.4.2.2 Microbiológicos

Microrganismos, devidamente imobilizados ao transdutor, atuam como elementos de biorreconhecimento nos biossensores microbiológicos. A utilização de micróbios, como bactérias, fungos e algas deve-se ao seu fácil cultivo, que permite manuseios simples, bem como maior viabilidade e estabilidade que células complexas. Esses microrganismos equivalem-se, comparativamente, a uma “fábrica”

de enzimas, coenzimas e cofatores, que quando devidamente ajustados (através do bloqueio ou indução de vias metabólicas), propicia respostas altamente seletivas. Essas características viabilizam sistemas analíticos simplificados, baratos e com ótimos desempenho. Biossensores microbiológico já foram empregados em investigações ambientais, na indústria alimentícia e na medicina (Su et al., 2011).

2.4.2.3 Imunossensor

Imunossensores, semelhante aos imunoensaios convencionais, caracterizam-se pelo reconhecimento da interação específica “anticorpo-antígeno”. Isso faz com que os imunossensores tenham alta especificidade e sensibilidade, no qual baseiam-se na imobilização de anticorpos, ou mesmo antígeno, a superfície do transdutor. Esses sistemas apresentam protocolos de montagens bem mais simples, baratas e rápidas que dos imunoensaios. Deste modo, permitindo dispositivos analítico portáteis ou sistemas de monitoramento em tempo real de moléculas como hormônios, por exemplo (Karachaliou et al., 2023; RICCI et al., 2012). Como alternativa às técnicas imunoanalíticas convencionais, os imunossensores possibilitam diversas aplicações, especialmente no diagnóstico clínico de várias patologias, bem como, no controle industrial e na fiscalização de alimentos (Aydin, et al., 2021).

2.4.2.4 Enzimático

A alta especificidade das enzimas em relação a moléculas específicas, juntamente com sua capacidade catalítica, levou à sua utilização como biorreceptores (Karunakaran et al., 2015). O glicosímetro, como primeiro biossensor a ser desenvolvido, marcou o início de uma nova era na pesquisa científica, graças ao trabalho de Clark e Lyons (Zhao et al., 2017). Os biossensores enzimáticos apresentam limites de detecção bem mais inferiores do que com ligações convencionais. Essa característica deve-se à catálise do substrato específico pela enzima, seguindo o princípio chave-fechadura. Portanto, sistemas analítico baseado em enzimas exibem maior seletividade e sensibilidade em comparação a outros tipos de biorreceptores (Karunakaran et al., 2015). Apesar do alto poder analítico, são facilmente influenciados por variações de temperatura, pH e concentração de substrato/enzima (Navaee et al., 2019).

2.4.3 Segundo ao evento de biorreconhecimento

2.4.3.1 Dispositivos de bioafinidade

Este grupo se destaca pela interação molecular específica, que envolve pontes de hidrogênio, interações iônicas ou dipolo induzido, entre os elementos sensores e seus ligantes/alvos correspondentes. Desta forma, os biossensores baseados em bioafinidade utilizam biorreceptores, como anticorpos, peptídeos, ácidos nucleicos, microrganismos, entre outros, na identificação e diferenciação do analito (Piroozmand et al., 2020).

2.4.3.2 Dispositivos biocatalíticos

Estes dispositivos tem como princípio a catálise enzimática. Alta seletividade das enzimas fazem com que ligar-se a alvos específicos. Assim, os biossensores biocatalíticos aproveitam os sinais elétricos gerados durante a catálise para a identificação do alvo molecular, gerando um produto secundário. Tal metodologia permite sistemas analíticos simples e compactos (Amaral et al., 2023).

2.4.4 De Acordo com o Transdutor

Dentre os principais transdutores destacam-se o eletroquímico, óptico, piezoelétrico e térmico.

2.4.4.1 Biossensor eletroquímico

Transdutores eletroquímicos convertem as informações químicas dos elementos incorporados, como concentração, composição e carga, em sinais elétricos mensuráveis. Neste princípio, as modificações entre o biorreceptor e o seu analito resultarão em um perfil elétrico distinto, que pode ser classificado como amperométrico (corrente), condutimétrico (condutância), potenciométrico (potencial) ou impedimétrico (impedância). Biossensores eletroquímicos são amplamente difundidos, englobando inúmeras aplicações, no reconhecimento de patógenos (Cesewski et al., 2020).

2.4.4.2 Biossensor óptico

Os biorreceptores ópticos traduzem as modificações físico-químicas produzidas no biorreconhecimento por meio da alteração no espectro de luz, como mudanças da fase, amplitude, polarização ou frequência da luz. Essa técnica permite plataformas compactas, super-rápidas e sensíveis (Karunakaran et al., 2015).

2.4.4.3 Biossensor piezoelétrico

Transdutores piezoelétricos são constituídos por um material piezoelétrico, como cristais de quartzo, cuja frequência de oscilação é modificada quando ocorre a ligação entre o biorreceptor e o analito. Essa variação na frequência é proporcional a massa do analito aderida à superfície do transdutor. Portanto, os biossensores piezoelétricos permitem identificar e quantificar pequenas quantidades de massa do alvo (Mabrouk et al., 2021).

2.4.4.4 Biossensor Térmico

Os transdutores calorimétricos, empregados em biossensores térmicos, convertem a energia térmica das reações químicas (exotérmica e endotérmica) em sinais elétricos. Enzimas são comumente escolhidas como biorreceptores devido à proporcionalidade entre os sinais térmicos gerados nas reações de catálise e a quantidade de substrato presente (Amaral et al., 2023).

2.4.5 Técnicas eletroquímicas

A utilização de biossensores eletroquímicos deve-se a sua simplicidade ao permitir detecções rápidas e precisas, sem que demande grande processamento das amostras. Além disso, podem ser facilmente integrados a dispositivos eletrônicos para criar sistemas de detecção compactos, baratos e de fácil manuseio. A detecção do analito em sistemas eletroquímicos dependem do tipo de técnica eletroquímica utilizada na interpretação dos sinais de biorreconhecimento. Dentre as principais técnicas eletroquímicas destaca-se: potenciométrica, que registra as alterações no potencial de circuito aberto; a amperométrica, que quantifica a corrente gerada nos

processos de oxirredução de espécies eletroativas; a impedimétrica, que quantifica a impedância resultante no sistema ao adicionar componentes à superfície do eletrodo (Hammond et al., 2016; Ronkainen et al., 2010).

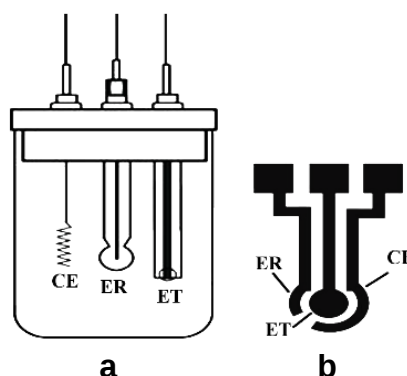


Figura 4. Célula eletroquímica (a) e eletrodo comercial (b) compostos pelo eletrodo de trabalho (ET), eletrodo de referência (ER) e contra-eletrodo (CE) na detecção eletroquímica. Fonte: modificado de Meneses, 2018.

Nas análises eletroquímicas, geralmente utiliza-se um circuito composto por três eletrodos: trabalho (ET), referência (ER) e contra-eletrodo (CE) (Figura 4). Os eletrodos tem grande impacto sobre as análises eletroquímicas, uma vez que podem ser influenciadas pelo material utilizado, pelas dimensões do eletrodo e até mesmo por modificações em sua superfície. Além disso, a solução eletroanalíticas tem grande importância sobre as reações realizadas adjacentes aos eletrodos. O eletrodo de referência, como o nome sugere, oferece um potencial padronizado ao sistema, enquanto que o contra-eletrodo possibilita o fluxo de corrente através do eletrodo de trabalho. As reações eletroquímicas, bem como as modificações de superfície, ocorrem sobre o eletrodo de trabalho. Este eletrodo geralmente é confeccionado por um material com alta condutividade e estabilidade química, como platina, ouro ou mesmo grafite (Grieshaber et al., 2008). Contudo, novos materiais tem sido utilizados em diferente arquiteturas de biossensoriamento, como eletrodos flexíveis.

2.4.6 Espectroscopia de Impedância eletroquímica (EIS)

Fenômenos físico-químicos que ocorram na interface do eletrodo podem ser caracterizados através da técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) (SINGH et al., 2021). Tal técnica consiste na aplicação de um potencial elétrico senoidal de baixa amplitude, cuja resposta no domínio da frequência fornece

informações referente a impedância. Essa característica é bastante explorada no desenvolvimento de biossensores impedimétricos, no qual a impedância é medida ao longo de uma faixa de frequência (geralmente entre 100 kHz e 1 MHz). Deste modo, é possível observar a interação do biorreceptor com analito através das variações impedimétricas da EIS (Cesewski et al., 2020; Hammond et al., 2016). Esse processo é demonstrado na Figura 5.

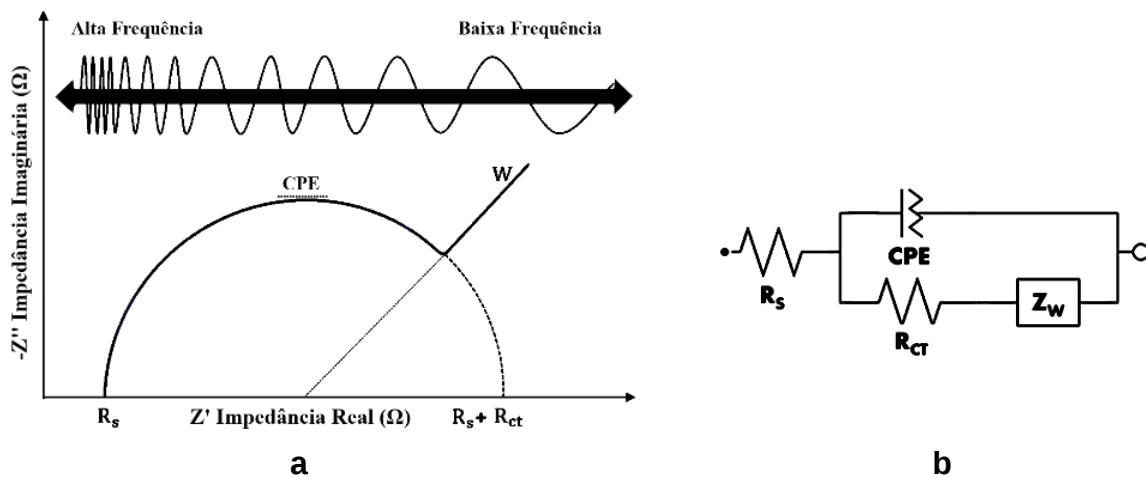


Figura 5. Demonstração do gráfico de Nyquist (a) frente aos elementos do circuito equivalente de Randles (b). Fonte: Próprio autor.

Normalmente, os resultados da impedância eletroquímica são representados em gráficos de Nyquist ou Bode. No gráfico de Nyquist, podemos identificar uma área semicircular que corresponde ao processo de transferência de elétrons (componente capacitivo, altura; processo resistivo, diâmetro), enquanto uma linha reta representa o processo de difusão (Figura 5a). Uma linha reta única se forma quando os elétrons fluem livremente, já um grande semicírculo é gerado quando há uma dificuldade na transferência dos elétrons. Deste modo, a resistência à transferência de elétrons é diretamente proporcional ao diâmetro do semicírculo (Karunakaran et al., 2015; Singh et al., 2021). Modelos de circuito equivalente são frequentemente utilizados na interpretação de dados impedimétricos, permitindo a sua comparação com elementos de circuito passivos, como resistores e capacitores. Nas análises de EIS, o circuito equivalente de Randles é o mais utilizado (Figura 5b). Esse circuito é composto pela: resistência de solução eletrolítica (R_s); elemento de fase constante (CPE); resistência à transferência de carga (R_{ct}) e impedância de Warburg (Z_w) (Cesewski et al., 2020)

2.4.7 Voltametria Cíclica (VC)

A voltametria corresponde a um conjunto de técnicas eletroanalíticas que utilizam a variação do potencial e a medição da corrente resultante na caracterização de um analito. A forma como o potencial é variado gera diferentes tipos de voltametrias, tais como: polarografia, varredura linear, pulso normal, pulso reverso, entre outras. Contudo, a voltametria cíclica (VC) é a técnica mais amplamente utilizada devido à facilidade de obter informações sobre o potencial redox e a cinética de reações eletroquímicas, na qual se baseia no princípio de oxiredução. A tensão na VC é mensurada entre o ER e o ET à medida que a corrente é registrada entre o ET e o CE. Deste modo, os resultados descritos no voltamograma são expressos como corrente em função da tensão (Grieshaber et al., 2008; Pacheco et al., 2013).

A presença de picos redução/oxidação no voltamograma cíclico é explicada por meio da equação de Nernst, a qual descreve a resposta do sistema frente a mudanças no potencial aplicado ou mesmo na uma variação na concentração de espécies na solução. A relação entre o potencial da célula eletroquímica (E), o potencial padrão das espécies (E^o) e a atividade do analito oxidado (Ox) / reduzida (Red) em equilíbrio no sistema é descrita na equação de Nernst:

$$E = E^o + \frac{RT}{nF} \ln \left(\frac{Ox}{Red} \right) = E^o + 2,3026 \frac{RT}{nF} \log_{10} \left(\frac{Ox}{Red} \right)$$

no qual R é a constante universal dos gases, T é a temperatura, n é o número de elétrons, F é a constante de Faraday. Um voltamograma cíclico típico é ilustrado na Figura 6.

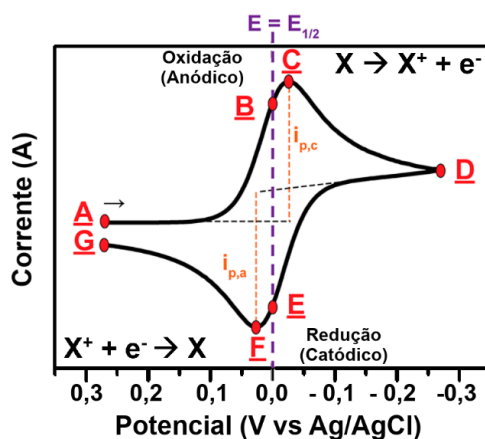


Figura 6. Voltamograma cíclico mostrando uma reação reversível. Fonte: modificado de Elgrishi et al., 2018.

Verifica-se que ao aplicar um potencial positivo (anódico) crescente (A-D), ocorre a oxidação do par redox X ($X \rightarrow X^+$) próximo à superfície do ET, resultando em uma corrente de pico anódica (ipa) proporcional à concentração do analito. A redução na ipa deve-se a saturação de X^+ na superfície do ET, que reduz o transporte de massa, de modo que não haverá mais reação de oxidação (C-D). Desta forma, a varredura é invertida ao atingir o ponto de comutação (D), variando negativamente o potencial (catódico) aplicado. Esse retorno faz com que haja redução do par redox X^+ na superfície do ET em X novamente (D-G). A corrente de pico catódica (ipc) gerada (F) neste processo será simétrica à ipa quando essa reação for reversível, como exemplificado na Figura 6 (Elgrishi et al., 2018; Pacheco et al., 2013).

2.5 PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS – AMPs

Os peptídeos antimicrobianos (AMPs) desempenham um papel crucial na defesa inata de diversos seres vivos. Organismos como plantas e invertebrados não possuem um sistema de imunidade adaptativa e, portanto, dependem essencialmente dos AMPs na defesa contra infecções provocadas por fungos e bactérias (Kumar et al., 2018). Em 1939, o microbiologista René Dubos conseguiu isolar o primeiro AMP, denominado gramicidina, a partir de cepas de *Bacillus* presente no solo. Desde então, mais de 3.000 AMPs já foram registrados (Li et al., 2022). Muitos desses peptídeos exibem um grande potencial terapêutico devido à sua seletiva atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-Positivas e Gram-Negativas (Mwangi et al., 2019). Essa especificidade decorre das interações eletrostáticas precisas dos AMPs com a membrana celular dos microrganismos. Os AMPs catiônicos demonstram uma maior afinidade por membranas com carga negativa, devido a influência da carga catiônica gerada pelos resíduos de arginina e lisina. Isso justifica a maior interação eletrostática com a parede bacteriana, que tem uma estrutura mais eletronegativa devido a presença do ácido teicoico e do lipopolissacarídeo, do que com membranas celulares eucarióticas que não possuem carga (Boparai et al., 2019; Kumar et al., 2018; Mwangi et al., 2019). Tais particularidades dos AMPs fazem com que sejam explorados como potenciais antibióticos de próxima geração contra microrganismos multirresistentes (Li et al., 2022).

Outra aplicação dos AMPs é o seu uso como biorreceptores seletivos na criação de biossensores destinados à detecção de patógenos. Isso decorre das suas

propriedades inerentes de hidrofobicidade e carga, que lhes permitem ligar-se de forma específica à membranas bacterianas (Stern Bauer et al., 2023). A utilização de AMPs na detecção de bactérias tem sido desenvolvida e incorporada em diversas áreas e dispositivos desde o início do século XXI. Um dos primeiros usos ocorreu na imagiologia médica, onde fragmentos de ubiquitina eram associados a isótopos ^{99m}Tc na construção de imagens. A capacidade de realizar modificações químicas oferece uma considerável versatilidade na integração dos AMPs em várias metodologias de biossensoriamento, além de possibilitar a modulação do grau de afinidade e da atividade bactericida (Pardoux et al., 2020). Além disso, são de fácil obtenção e baixo custo de síntese, já que podem ser selecionados dentro de um banco de dados. Outra vantagem dos AMPs é devido ao seu baixo peso molecular, o que os torna mais flexíveis e estáveis em comparação com os anticorpos ou moléculas mais complexas. Essas peculiaridades favorecem a construção, acondicionamento e reprodutibilidade dos biodispositivos baseados em peptídeo (Tertis et al., 2021).

2.6 NONOMATERIAIS

O desenvolvimento de nanomateriais possibilitaram a criação de nanotecnologias distintas, envolvendo várias áreas de aplicação, especialmente no campo biomédico (Mabrouk et al., 2021). Os nanomateriais podem ser constituídos por estruturas de carbono, nanopartículas metálicas, óxidos metálicos, materiais semicondutores, pontos quânticos e nanomateriais orgânicos, além dos nanocompósitos derivados da associação entre eles (Sheikhzadeh et al., 2021). Devido suas características físico-químicas intrínsecas, como propriedades mecânicas, magnéticas, ópticas, térmicas, químicas e elétricas, fazem os nanomateriais serem bastante explorados na construção de novos biossensores (Su et al., 2018; Ungureanu et al., 2022).

As nanopartículas de ouro (AuNPs) apresentam excelentes propriedades ópticas, bem como eletroquímicas, como acelerar a transferência de elétrons na superfície do eletrodo e exercer atividade eletrocatalíticas. A área de superfície elevada das AuNPs favorecem a incorporação de moléculas para biossensoriamento (Farzin et al., 2022; Yang et al., 2023). O óxido de grafeno (GO), obtido pela oxidação do grafite, apesar de eletricamente resistivo apresenta grupos funcionais de oxigênio (COOH , OH ; C=O e epóxi) que permitem a associação com outros nanomateriais mais

condutores. Além de poder aperfeiçoar a capacidade elétrica, esses grupos funcionais dão ao GO maior biocompatibilidade com biomoléculas (Thangamuthu, 2019; Yildiz, 2021). O polipirrol (PPy) é um excelente polímero condutor de fácil síntese, boa estabilidade ambiental e alta condutividade eletrônica. Dependendo do arranjo estrutural, as propriedades condutivas do PPy podem ser aprimoradas, tornando-o ótimo na montagem de sensores eletroquímicos (Dzulkurnain et al., 2021; Hao et al., 2022).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um biossensor baseado no nanocompósito de polipirrol-óxido de grafeno-ouro associado ao peptídeo antimicrobiano Lt-MAP4 como biorreceptor para identificação e diferenciação de bactérias de interesse clínico.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Avaliação físico-química dos parâmetros relacionados às etapas de modificação da superfície do eletrodo metálico;
- ❖ Determinação das propriedades bioeletroquímicas da modificação covalente de Lt-MAP4 e nanocompósito de polipirrol-óxido de grafeno-ouro;
- ❖ Avaliação dos fenômenos interfaciais do sistema sensor e sua utilização para fabricação de biodispositivos;
- ❖ Caracterização da interação do sistema sensor com as bactérias *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Klebsiella pneumoniae* e *Serratia marcescens* através das técnicas de EIS e VC;
- ❖ Avaliação teórica do elemento de fase constante (CPE) e da resistência à transferência de carga (R_{CT}) através de circuitos equivalentes.
- ❖ Determinação das correntes de pico anódicas (i_{pa}) e catódicas (i_{pc}) dos voltamogramas cíclicos;
- ❖ Utilização da técnica de EIS para caracterização impedimétrica da interação de nanocompósito de polipirrol-óxido de grafeno-ouro associado a Lt-MAP4 com diferentes tipos de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas.

4 METODOLOGIA

Conduziu-se uma pesquisa experimental, no qual desenvolveu e avaliou a aplicação de um sistema sensor frente à bactérias de interesse clínico, utilizando-se de análises qualitativas e quantitativas, bem como estatística dos resultados obtidos.

4.1 MATERIAIS

L-Cisteamina (cys) 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil), carbodiimida (EDC), N-Hidroxisuccinimida (NHS) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (USA). Etanol, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Pirrol, NaClO , alumina ($0,04\mu\text{m}$). Fosfato de sódio monobásico, fosfato de sódio dibásico, ferricianeto de potássio ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) e ferrocianeto de potássio ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) foram obtidos pela VETEC (Brasil). Peptídeo Lt-MAP4 (AKKLAKYLKKA), água ultrapura obtida pelo sistema de purificação Millipore Milli-Q (Billerica, EUA), potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT 128N (Metrohm, Holanda), NOVA 1.11, Origin Pro 9 (OriginLab, EUA).

4.2 SÍNTESE DO NANOCOMPÓSITO DE POLIPIRROL-ÓXIDO DE GRAFENO-OURO

Em um balão de fundo chato, foram adicionados 20 mL etanol com 1,5 mL de pirrol sob agitação. Posteriormente adicionou AuNPs (5 mL) e 30 mg de Óxido de Grafeno (GO), mantendo sob agitação magnética constante por 1h (Figura 7). Em seguida, foi preparado 200 mL de etanol com $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (9g, 33 mM) que foi gotejada na solução de Pirrol com AuNPs e GO, deixando sob agitação por 24h a 25°C . O nanocompósito sequencialmente foi filtrado com água e acetona para remover o pirrol e cloreto férrico e seco em estufa a 50°C . Posteriormente o nanocompósito foi ressuspenso em água deionizada/destila (1 mg/mL) para que pudesse ser usado.

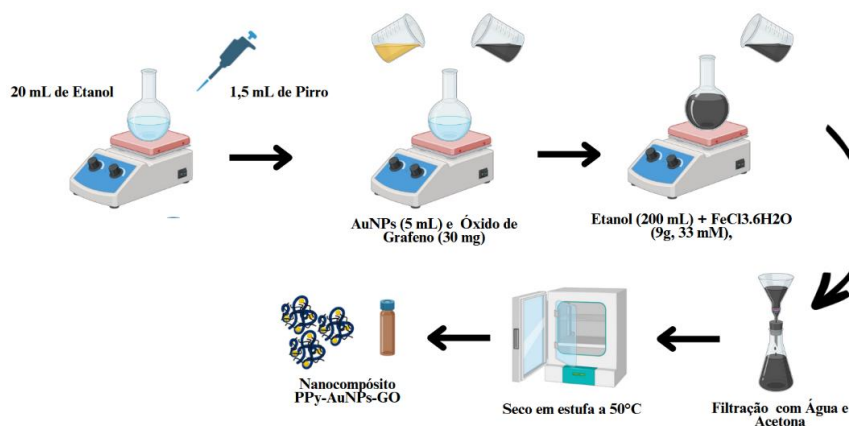


Figura 7. Síntese do nanocompósito. Fonte: próprio autor

4.3 MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE DO ELETRODO

O eletrodo de barra de ouro (BGE) foi polido suavemente em feltro com pasta de alumina ($0,04\mu\text{m}$), realizando movimentos circulares. Posteriormente, o BGE foi novamente friccionando em lixa de alta granulação (1200) para retirar resquícios da alumina aderida e deixado em imersão de NaClO por 5 min. Com a superfície de ouro limpa, deu-se seguimento a montagem da monocamada automontada (SAM), imergindo o eletrodo em solução aquosa de cisteamina (50mM) por 15 min em temperatura ambiente. Entre cada etapa de modificação o eletrodo foi enxaguado com água deionizada/destilada. Sequencialmente, a superfície de ouro como SAM foi modificada adicionando 2 ali de EDC/NHS (0,4M / 0,1 M) (1:1, v/v) juntamente com 4 μL do nanocompósito (PPy-AuNPs-GO) até completa adsorção. Os grupos carboxílicos (COOH) do óxido de grafeno, ao serem ativados pelo EDC/NHS, geram ésteres de NHS que permitem ligar-se a SAM através dos grupos amina livres da cisteamina. Após seco, cuidadosamente foi retirado com papel o excesso de nanocompósito em torno do eletrodo. Posteriormente, 2 μL de EDC/NHS (0,4M / 0,1 M) (1:1, v/v) foi adicionado para ativar outras vez os grupos COOH do óxido de grafeno. Ao passar 5 min, gotejou-se 2 μL do peptídeo LT-MAP4 a superfície do eletrodo, no qual permaneceu em incubação por 20 min. O excesso de peptídeos não adsorvido foi removido um jato suave de água deionizada/destilada na lateral do eletrodo.

Com a montagem finalizada, capacidade analítica foi avaliada diante de suspensões bacterianas na ordem de concentração de 10^1 a 10^5 CFU mL^{-1} . O eletrodo foi submerso por 5 min na suspensão bacteriana, de modo que gera-se o biorreconhecimento, realizando a análise sequencial das concentrações de cada patógeno. A solução salina foi utilizada nas suspensão dos microrganismos, com intuito de manter sua integridade e viabilidade, prevenindo de mudanças brusca de pH ou temperatura que causassem a sua morte (Zamzami et al., 2023). Dentre as bactérias de importância clínica foram avaliadas: *S. aureus*, *K. pneumoniae* e *E. coli*.

4.4 MEDIÇÕES ELETROQUÍMICAS

A caracterização da plataforma biossensora, bem como, das respostas de bioreconhecimento foram obtidas por meio de análises voltamétricas e

impedimétricas. Os estudos realizam-se em uma estação de trabalho eletroquímica potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT 128N (Metrohm, Holanda) em temperatura ambiente. A célula eletroquímica foi composta por três eletrodos, como seguem: eletrodo de fio de platina como CE; eletrodo Ag/AgCl (saturado com KCl 3 M) como ER; e, eletrodo de barra de ouro (BGE) como ET. Os experimentos com voltametria cíclica (VC) foram realizados com o potencial digitalizado de - 0,2 até 0,7 V a uma taxa de varredura de 50 mV s⁻¹. As verificações de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) ocorreram sob potencial de onda senoidal com amplitude de 10 mV e 30 pontos de dados distribuídos em uma faixa de frequência de 100 mHz a 100 kHz. Estudos eletroquímicos foram realizados dentro de uma gaiola de Faraday, e na presença de solução de 10 mM de ferro-ferricianeto de potássio (K₃[Fe(CN)₆]/K₄[Fe(CN)₆]) (1:1, v/v) preparado em tampão fosfato salino (PBS) pH 7,4 como sonda redox. O software empregado para interface gráfica foi o NOVA 1.11 enquanto que a plotagem dos dados foram feitas no software Origin Pro 9 (OriginLab, EUA)

4.5 MEDIDAS UV-VIS

A suspensão do nanocompósito, juntamente com uma solução coloidal de AuNPs puras, tiveram a sua absorbância medidas através da espectrofotômetro de UV/visível de modelo K37-UVVIS (Kasvi, Br) ao longo da faixa de comprimento de onda de 250-700nm.

4.6 MEDIÇÕES NO FTIR

Medições de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) do nanocompósito e AuNPs puras foram realizados ao longo do número de ondas compreendidas entre 650 cm⁻¹ a 4000 cm⁻¹ através do espectrômetro FTIR Agilent Cary 630 (Agilent Technologies, Rowville, Austrália)

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 SENSOR PPY-AUNPS-GO-LT-MAP4

O biorrenhecimento, bem como, as demais modificações para construção do sistema sensor sobre o BGE podem ser observadas na representação esquemática da Figura 8.

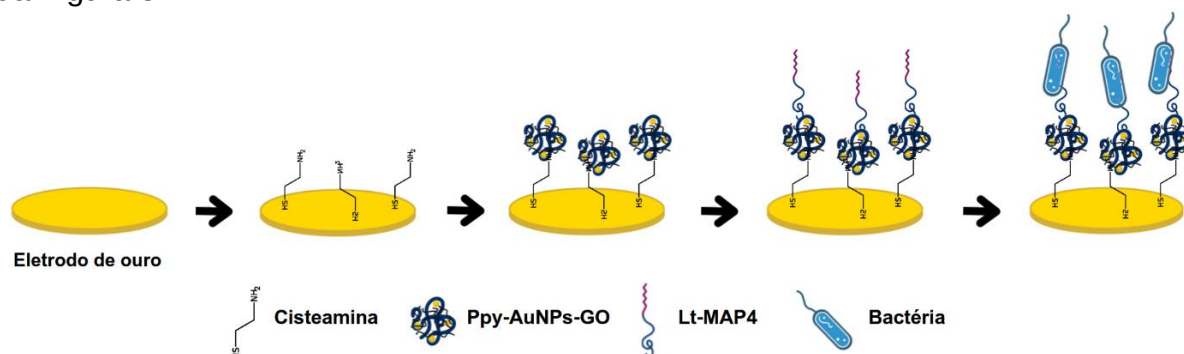


Figura 8. Montagem do sistema sensor Cys-PPy-AuNPs-GO-Lt-MAP4. Fonte: Próprio autor.

5.2 ANÁLISE UV-VIS E FTIR DO NANOCOMPÓSITO

A caracterização do nanocompósito de PPy-AuNPs-GO foi realizada através das técnicas de espectroscopia UV/visível (UV-vis) e espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). A avaliação do espectro eletromagnético por meio do UV-vis (Figura 9a) demonstrou que as AuNPs ao serem incorporadas tiveram seu pico de absorção típico entorno de 529 nm omitido (Azri et al., 2019). Contudo, observou-se um pico difuso entre 250-300 nm correspondente à sobreposição do PPy com o GO. A transição $n \rightarrow \pi^*$ dos grupos carbonila do GO puro expressa um pico em 300 nm enquanto que a transição eletrônica da orbital molecular do anel aromático na cadeia polimérica do PPy gera um pico próximo à 312 nm (Tene et al., 2021; Ullah et al., 2022). Através disso, o perfil do PPy-AuNPs-GO expresso pelo UV-vis sustenta a presença de agregação e interação entre os componentes.

Os distintos grupos funcionais presentes no nanocompósito foram verificados no FTIR (Figura 9b). Onde o GO amplo faixa de pico em $3600-2900\text{ cm}^{-1}$ corresponde ao estiramento do grupo carboxil (O-H), enquanto que o pico próximo a 1600 cm^{-1} pertence a trecho de grafite não oxidado (C=C). Além disso, o pico entre 1450 cm^{-1} está ligado ao epóxi (C-O) ao mesmo tempo que o pico visto perto de 1300 cm^{-1} corresponde ao estiramento do grupo álcool (C-OH) (Rosas-Laverde et al., 2020). Já

entre 1450-1470 cm^{-1} é observável as vibrações do estiramento das ligações C-N do anel pirrol, enquanto as ligações C-H do anel são evidentes em torno de 1030 cm^{-1} (Ullah et al., 2022). Apesar de não visualizadas distintamente no nanocompósito, as AuNPs apresentam picos de transmitâncias compreendido nas faixa de 3240 e 1690 cm^{-1} quando puro (Azri et al., 2019).

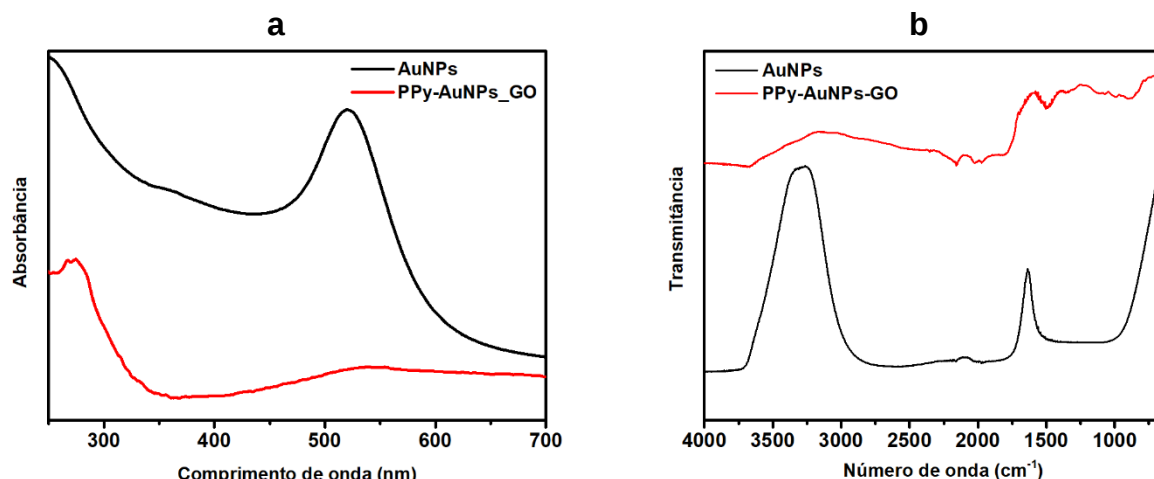


Figura 9. Caracterização do nancompósito pelas técnicas de UV-vis (a) e FTIR (b). Fonte: Próprio autor.

5.3 CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DA PLATAFORMA BIOSSENSORA

A caracterização da construção sequencial da plataforma biossensora associada ao peptídeo Lt-MAP4 foi realizada mediante seu comportamento na VC e EIS. Ao observar o gráfico de VC (Figura 10a), verifica-se uma natureza reversível dos picos anódicos e catódicos, associado a integridade da plataforma mesmo após as varreduras potenciais. Apesar disso, somente os dados dos picos anódico (ipa) foram utilizados nas análises.

O BGE limpo apresenta picos anódicos e catódicos bem definidos, com uma resposta elétrica de 59,35 μA no pico anódico. Contudo, alterações na transferência elétrica são verificadas ao logo das modificações na plataforma. Onde adsorção da cys provocou aumento da ipa (62,51 μA) devido à atração eletrostática entre seu grupo amina, carregado positivamente, e o par redox de carga negativa, com elevação no trânsito de elétrons (Moustakim et al., 2022). A ligação da cys à superfície do ouro é realizada através do grupo tiol, que devido sua forte atração com o ouro cria um fino filme altamente organizado, referido como uma monocamada automontada (SAM). Essa configuração permite que a cys atue como molécula espaçadora, fazendo com

que os eventos de oxiredução ocorram adjacentes à superfície do eletrodo (Kim et al., 2021). Ao adicionar PPy-AuNPs-GO, verifica-se uma redução discreta no pico anódico ($60,41 \mu\text{A}$) ao ligar-se a cys, devido ao bloqueio no trânsito de elétrons facilitado entre o par redox. Apesar da diminuição no pico, a semelhança com o perfil do eletrodo limpo indica que nanocompósito apresenta uma boa capacidade elétrica. Isso deve-se a alta condutividade de PPy e das AuNPs que favorecem a fluxo elétrico (German et al., 2020). Apesar disso, há uma significativa redução ($56,12 \mu\text{A}$) ao imobilizar o Lt-MAP4 à plataforma, que indica maior dificuldade a passagem dos elétrons devido à complexidade e tamanho do AMP.

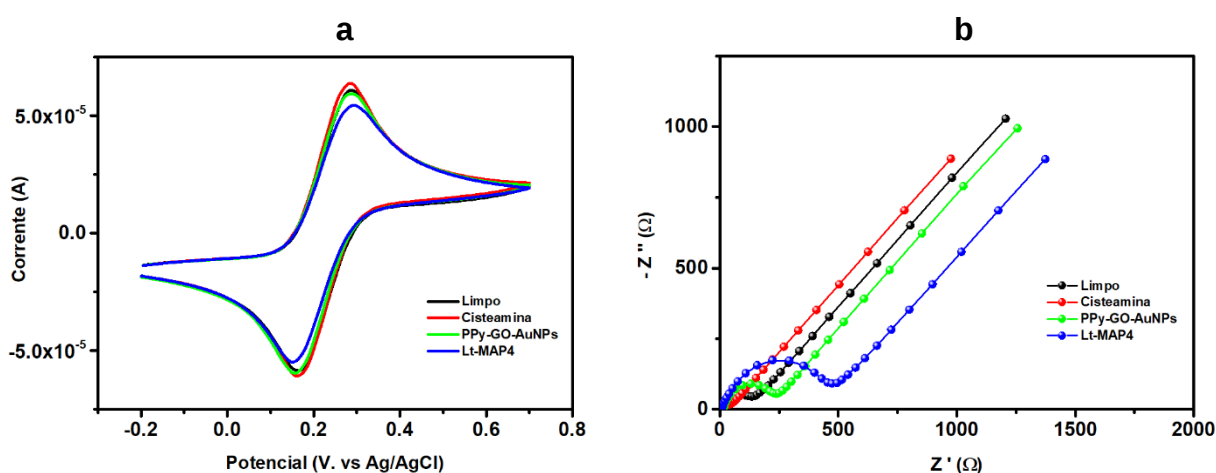


Figura 10. Voltamograma cíclico (a) e diagrama de Nyquist (b) referentes a montagem da plataforma.

Outras informações da modificação da superfície do eletrodo foram obtidas através da EIS, quantificando a resistência à transferência de carga (R_{CT}). O valor do R_{CT} , que está relacionado ao diâmetro do semicírculo de Cole-Cole, permite a avaliação da cinética de transferência de elétrons da sonda redox (Silva Junior, 2018). No diagrama de Nyquist (Figura 10b) observa-se um pequeno semicírculo no BGE limpo ($R_{CT} = 0,123 \text{ k}\Omega$) devido a passagem desimpedida dos elétrons. No entanto, observa-se uma diminuição no tamanho do semicírculo ao cobrir a superfície de ouro com cys. Isso ocorre devido à atração eletrostática do grupo amina com par redox, o que resulta em uma menor resistência à transferência de cargas ($R_{CT} = -1,434 \text{ k}\Omega$). Já ao imobilizar o PPy-AuNPs-GO observa-se um semicírculo bem baixo, demonstrando fluxo livre dos elétrons, com um leve aumento no R_{CT} ($R_{CT} = 0,182 \text{ k}\Omega$). Por outro lado, ao conjugar o Lt-MAP4 a plataforma resulta em uma maior dificuldade a passagem dos elétrons ($R_{CT} = 0,394 \text{ k}\Omega$), expressa pelo aumento do semicírculo. Esses resultados respaldam com os obtidos na VC.

5.4 PERFORMANCE ANALÍTICA DO BIOSENSOR

Através dos voltamogramas cíclicos apresentado na Figura 11 (a; c; e), constata uma redução gradual nos picos anódicos e catódicos, proporcional a concentração bacteriana à qual foram expostos. Isso indica que houve reconhecimento das bactérias, na qual o peptídeo Lt-MAP4 aderido à plataforma interage eletrostaticamente com elementos da parede bacteriana, dificultando a passagem de corrente.

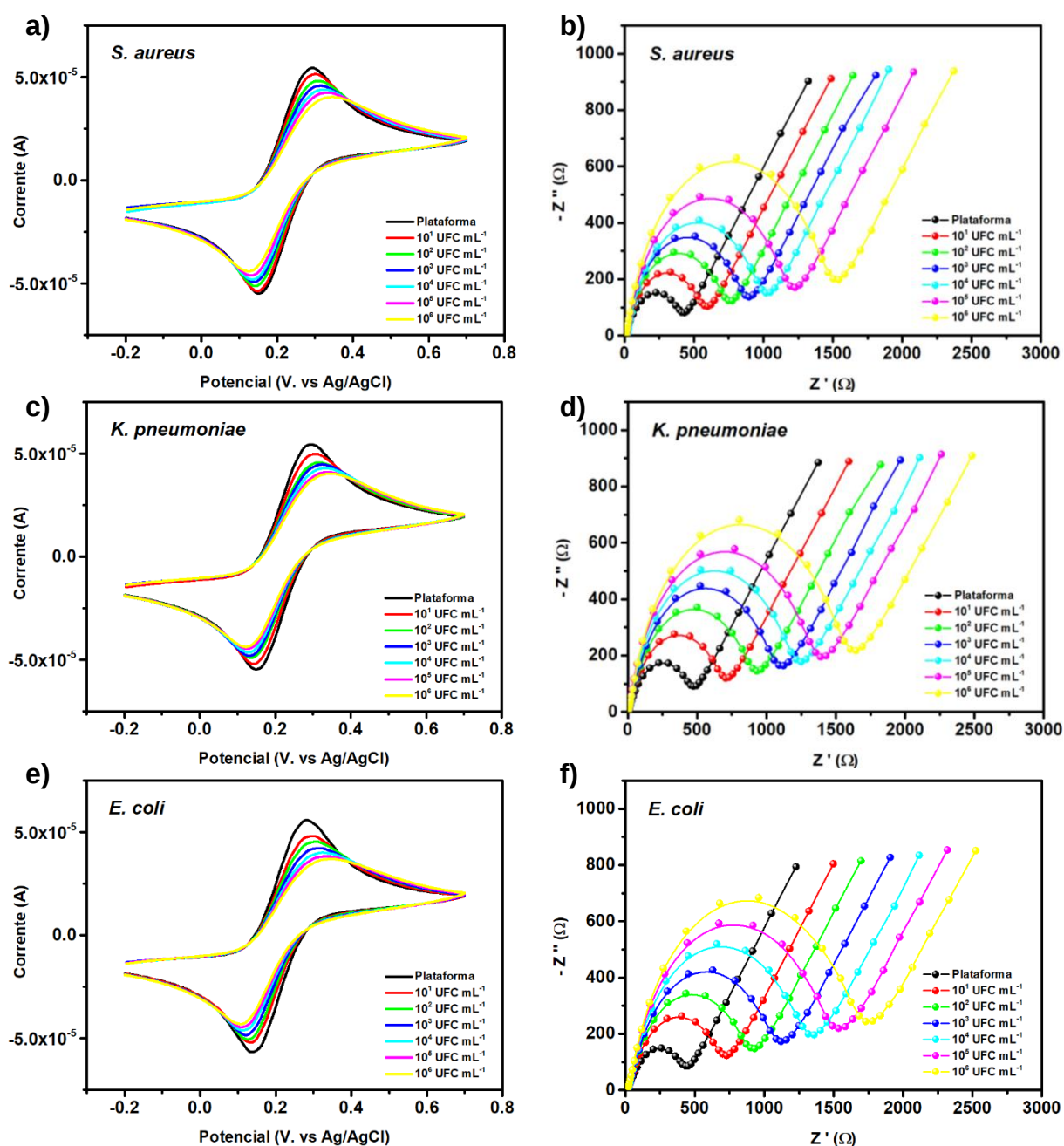


Figura 11. Análise voltamétrica (a; c; e) e impedimétrica (b; d; f) do biossensor frente as concentrações bacterianas.

Uma melhor distinção entre as respostas de biorreconhecimento de cada microrganismo pode ser alcançado através da porcentagem de desvio relativo da variação da corrente anódica (ΔI) (Silva Junior, 2021). Calculou-se o ΔI usando a seguinte fórmula:

$$\Delta I(\%) = \frac{\left[\left(\frac{1}{I_b}\right) - \left(\frac{1}{I_a}\right)\right]}{\left(\frac{1}{I_b}\right)} \times 100$$

na qual I_a representa à i_{pa} da plataforma, obtida ao incorporar o peptídeo, enquanto que o I_b corresponde ao i_{pa} obtido após interação com o analito.

Os resultado de ΔI para as três bactérias são expressas na Tabela 4. Verifica-se que os valores de ΔI eleva proporcionalmente ao aumento da concentração, expressa em UFC.mL⁻¹. Além disso, nota-se uma leve distinção entre os valores expressos pelos microrganismos avaliados. Onde as bactérias *E. coli* e a *K pneumoniae*, ambas Gram-negativas, demonstraram, em geral, um valor de ΔI superior ao observado para o *S. aureus*.

Tabela 4. Variação da corrente anódica (ΔI) após interação com as bactérias (10¹-10⁵ UFC mL⁻¹).

Bactérias	Plataforma i_{pa} (μA)	UFC mL-1 / i_{pa} (μA)					
		10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶
	56,12						
S. aureus:		50,64	46,74	44,17	42,29	39,81	36,78
$\Delta I\%$ =		9,77%	16,72%	21,29%	24,64%	29,06%	34,46%
K. pneumoniae:		48,89	44,99	42,44	40,28	38,12	36,94
$\Delta I\%$ =		12,88%	21,61%	24,36%	28,22%	32,06%	34,16%
E. coli:		47,32	43,89	40,44	37,54	35,52	33,49
$\Delta I\%$ =		15,67%	21,78%	27,93%	33,10%	36,70%	40,31%

Através dos gráficos de impedância de Nyquist (Figura 11b; d; f) podemos verificar uma sutil diferenças entre os perfis de biorreconhecimento. Uma maior resistência a transferência de cargas, associada ao aumento no diâmetro do semicírculo, é observada nas bactérias Gram-negativas (*E. coli* e *K pneumoniae*). Essa diferença entre Gram-negativas e Gram positivas corrobora com o que foi observado no trabalho de Miranda et al., 2017, que empregou o AMP Clavanin A como biorreceptor na identificação de bactérias.

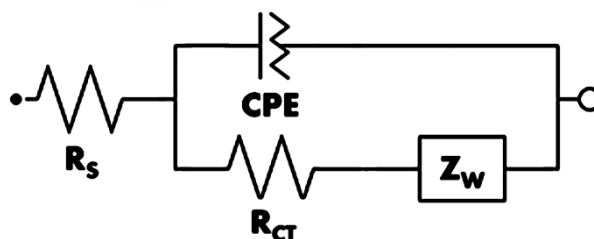


Figura 12. Circuito equivalente de Randles utilizado no ajuste dos dados impedimétricos. Fonte: Próprio autor.

Os dados impedimétricos foram ajustados ao circuito equivalente de Randles (Figura 12) de modo a avaliar quantitativamente os fenômenos interfaciais da plataforma sensora. O circuito é constituído: resistência de solução eletrolítica (R_s); elemento de fase constante (CPE); resistência à transferência de carga (R_{ct}) e a impedância de Warburg (Z_w). Os valores de R_{ct} , assim como da CPE, tem íntima relação com as modificações da interface eletroquímica do eletrodo. Desta forma, alterações no perfil impedimétrico da superfície do eletrodo com o par redox são caracterizados pelo R_{ct} , o qual tem direta associação a massa bacteriana exposta ao biossensor (Silva Junior et al., 2021). Os valores dos elementos de circuitos da plataforma e biorreconhecimento de cada bactéria são apresentados na Tabela 5.

Modificação do Eletrodo	CFU mL ⁻¹	R_{ct} (k Ω)	CPE (μ Mho)	N	R_s (Ω)	W (mMho)
Plataforma	***	0,394	4,37	0,788	313	1,02
<i>S. aureus</i>	10 ¹	0,530	2,48	0,839	311	0,97
	10 ²	0,695	2,10	0,858	313	0,96
	10 ³	0,821	1,96	0,848	314	0,95
	10 ⁴	0,942	1,83	0,875	325	0,96
	10 ⁵	1,140	1,74	0,882	318	0,96
	10 ⁶	1,440	1,59	0,890	316	0,96
<i>K. pneumoniae</i>	10 ¹	0,657	2,52	0,722	310	0,98
	10 ²	0,873	2,11	0,862	314	0,98
	10 ³	1,037	1,93	0,872	315	0,98
	10 ⁴	1,180	1,84	0,878	308	0,97
	10 ⁵	1,337	1,74	0,884	304	0,96
	10 ⁶	1,547	1,67	0,890	312	0,96
<i>E. coli</i>	10 ¹	0,658	3,88	0,810	317	1,10
	10 ²	0,848	3,28	0,827	314	1,09
	10 ³	1,040	3,05	0,836	320	1,08
	10 ⁴	1,260	2,84	0,844	317	1,07
	10 ⁵	1,443	2,70	0,850	315	1,06
	10 ⁶	1,653	2,57	0,855	315	1,05

Tabela 5. Valores dos elementos do circuito equivalente de Randles após exposição a distintas concentrações bacterianas (10¹-10⁵ UFC mL⁻¹).

Apesar do crescimento linear para os três patógenos, as bactérias Gram-negativas (*E. coli* e *K. pneumoniae*) expressaram maior R_{CT} . Essa predileção do peptídeo Lt-MAP4 pode estar atrelada a diferença na constituição da parede bacteriana (Kumar et al., 2018). Na qual as bactérias Gram-negativas possuem uma membrana externa muito negativa, devido à alta quantidade de lipopolissacarídeo aniônico, favorecendo interações eletrostáticas e hidrofóbicas (Pardoux et al., 2020).

Uma curva de calibração, baseada na variação da resistência à transferência de cargas (ΔR_{CT}), foi utilizada na avaliação da capacidade analítica do biossensor. A relação linear do $\Delta R_{CT}\%$ frente a concentração do analito é expressa pela seguinte equação:

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

onde $R_{CT(Bact.)}$ corresponde ao valor do R_{CT} obtido após a exposição às suspensões bacterianas enquanto que o $R_{CT(Plataf.)}$ está ligado ao R_{CT} da plataforma Cys-PPy-AuNPs-GO quando houve imobilização do Lt-MAP4. Esses dados são apresentados na Figura 13.

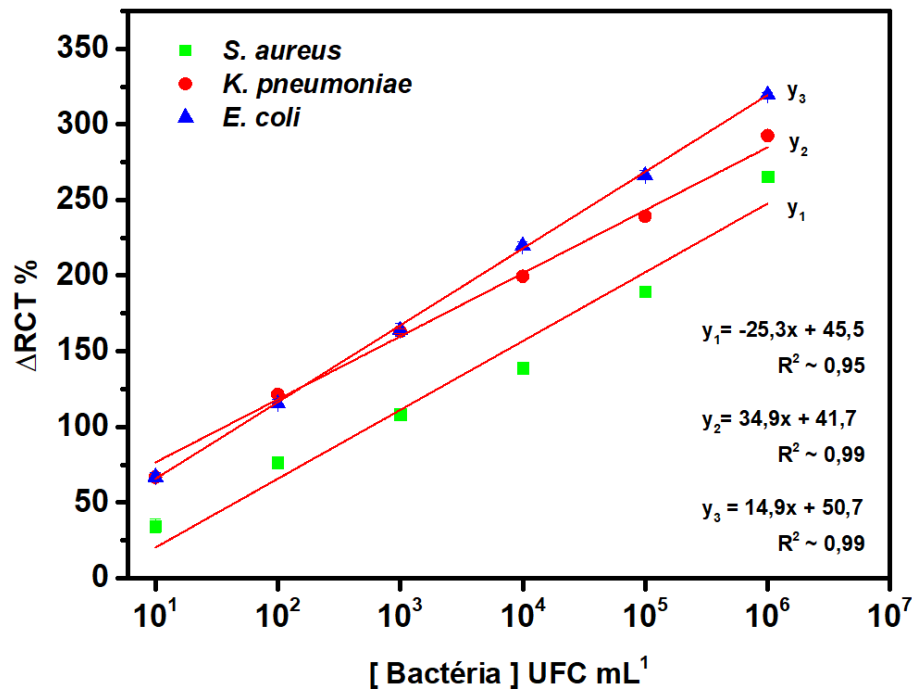


Figura 13. Curva de calibração obtida usando os valores de $\Delta R_{CT}\%$

Como demonstrado, há uma relação entre a concentração e o tipo bacteriano analisado. Esse perfil linear de reconhecimento é justificado pela diferença na

constituição dos alvos. Deste modo, os valores de ΔRCT obtidos para o *S. aureus*, como previsto, permaneceram menores em comparação aos da *K. pneumoniae* e da *E. coli*. Essa distribuição mostram-se concisa ao traçar a reta da curva de calibração, resultando em um coeficiente de determinação (R^2) superior a 0,95. Essa associação entre ΔRCT a massa bacteriana, entre as três espécies analisadas, pode ser melhor visualizada na Figura 14.

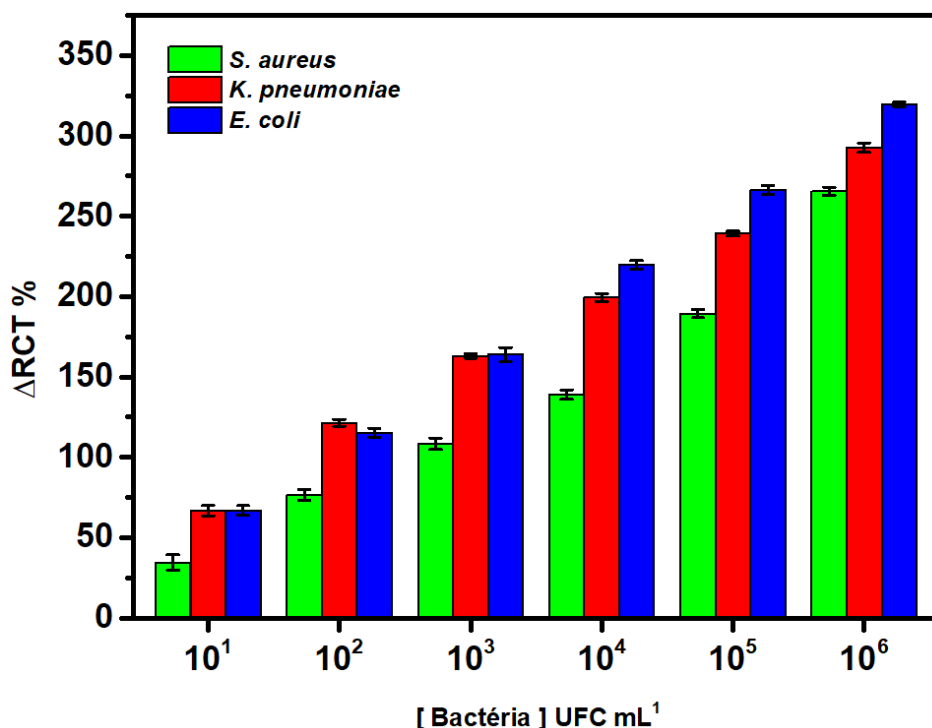


Figura 14. $\Delta RCT\%$ após exposição a diferentes espécies de bactérias.

Através da quantificação do recobrimento da camada sensora (θ) é possível avaliar os sítios de ligação ocupados pelas bactérias, segundo a seguinte equação:

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

no qual o $R_{CT(plat)}$ é referente ao R_{CT} da plataforma Cys-PPy-AuNPs-GO-Lt-MAP4 enquanto que o $R_{CT(bac)}$ corresponde ao valores de R_{CT} após a exposição a bacteriana. Os dados obtidos são expressos na Figura 15. Ao observar o gráfico, verifica-se que aumento de θ está diretamente relacionada à quantidade de colônias bacterianas expostas, com ressalve ao maior crescimento para as Gram-negativas. Assim, os valores representados por θ coincidem com os dados obtidos no ΔRCT .

Isso permite inferir que o sistema sensor além de interagir com as células bacteriana apresenta resposta específicas segundo a composição da parede bacteriana.

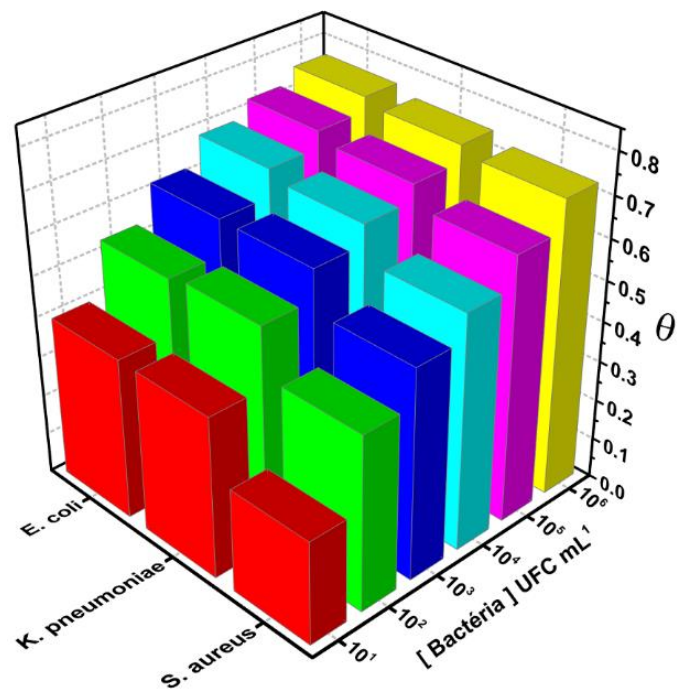


Figura 15. Recobrimento da camada sensora (θ) após reconhecimento bacteriano (10^1 - 10^5 UFC mL⁻¹)

6 CONCLUSÃO

No presente estudo, um biossensor eletroquímico constituído por monocamada de cisteamina, nanocompósito de PPy-AuNPs-GO e peptídeo antimicrobiano Lt-MAP4 foi empregado na detectar bactérias de importância médica. O nanocompósito frente as análises de UV-vis e FTIR demonstrou a associação do PPy com o GO, perante o reconhecimento dos seus grupos funcionais. Além disso, o nanocompósito apresentou ótima condutividade ao ligar-se a SAM de cys, bem como, possibilitou a funcionalização do peptídeo Lt-MAP4 a plataforma, conforme verificada nas técnicas de VC e EIS. A performance analítica do biossensor frente as suspensões bacterianas de *E. coli*, *K. pneumoniae* e *S. aureus* mostrou-se bem sucedida segundo os dados de i_p e R_{CT} . Através dos cálculos de ΔI , ΔR_{CT} e θ verificou-se a correlação linear entre a concentração bacteriana apresentada e a resposta do biossensor, na qual foram quantitativamente maiores para os Gram-negativos. Isso demonstra que o peptídeo antimicrobiano Lt-MAP4 tem maior sensibilidade às bactérias Gram-negativas, devido sua parede bacteriana eletricamente negativa. Contudo, novos testes devem ser realizados, como análise da adsorção dos componentes através da técnica de AFM, avaliar outras espécies bacterianas, bem como, verificar a interação com fungos e controles negativos. Desta forma, o sistema sensor proposto mostra-se como uma alternativa promissora as técnicas convencionais de identificação bacteriana, possibilitando futuramente sua aplicado no reconhecimento de amostras clínicas e hospitalares.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Boletim Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº 16: Avaliação dos indicadores nacionais das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) e Resistência microbiana do ano de 2016**. Brasília: [s.n.]. Disponível em: < <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/servicosdesaude/boletim-seguranca-do-paciente/boletim-seguranca-do-paciente-e-qualidade-em-servicos-de-saude-no-16/@@download/file>>. Acesso em: 26 ago. 2023.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Programa Nacional de Prevenção e Controle de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (PNPCIRAS) 2021 a 2025**. Brasília: [s.n.]. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/servicosdesaude/publicacoes/pnpciras_2021_2025.pdf>. Acesso em: 27 ago. 2023.

ALI, S. et al. Healthcare associated infection and its risk factors among patients admitted to a tertiary hospital in Ethiopia: longitudinal study. **Antimicrobial resistance and infection control**, [s. l.], v. 7, p. 2, 1 dez. 2018.

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

ALLEGGRANZI, B. et al. Burden of endemic health-care-associated infection in developing countries: systematic review and meta-analysis. **Lancet (London, England)**, [s. l.], v. 377, n. 9761, p. 228–41, 15 jan. 2011.

AMARAL, E. M. F. et al. Electrochemical Sensors and Biosensors: Their Basic Working Principles and Some Applications. **Revista Virtual de Química**, [s. l.], v. 15, n. 3, p. 519–535, 2023.

ARYA, S. K. et al. Recent advances in ZnO nanostructures and thin films for biosensor applications: Review. **Analytica Chimica Acta**, [s. l.], 6 ago. 2012.

AYDIN, M. et al. Advances in immunosensor technology. **Advances in Clinical Chemistry**, Academic Press Inc., [s.l.], v. 102, p. 1–62, 2021.

AZRI, F. A. et al. Etlingera elatior-Mediated Synthesis of Gold Nanoparticles and Their Application as Electrochemical Current Enhancer. **Molecules**, [s.l.], v. 24, n. 17, p. 3141, 29 ago. 2019.

BASSETTI, S. et al. Optimizing antibiotic therapies to reduce the risk of bacterial resistance. **European Journal of Internal Medicine**, Elsevier B.V., [s.l.], v. 99, n. 1, p. 4–16, 2022.

BENDER, A. L.; MÜHLEN, C. A. VON. Testes Laboratoriais Aplicados à Imunologia Clínica. Em: **Imunologia Clínica na Prática Médica**. Rio de Janeiro: [s.n.]. p. 7–12, 2022.

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

BHARADWAJ, A. et al. Multidrug-Resistant Bacteria: Their Mechanism of Action and Prophylaxis. **BioMed Research International**, Hindawi Limited, [s.l.], p. 1–17, 2022.

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

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

CARPENTER, A. C. et al. Blueprints for biosensors: Design, limitations, and applications. **Genes**, MDPI AG, [s.l.], v. 9, n. 8, p. 375, 1 ago. 2018.

CASSINI, A. et al. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, [s.l.], v. 19, n. 1, p. 56–66, 1 jan. 2019.

CASTILLO-HENRÍQUEZ, L. et al. Biosensors for the detection of bacterial and viral clinical pathogens. **Sensors (Switzerland)**, [s.l.], v. 20, n. 23, p. 1–26, 1 dez. 2020.

CESEWSKI, E. et al. Electrochemical biosensors for pathogen detection. **Biosensors and Bioelectronics**, Elsevier Ltd, [s.l.], v. 159, p. 112214, 1 jul. 2020.

CHEN, R. et al. Establishment and evaluation of an indirect ELISA for detection of antibodies to goat *Klebsiella pneumonia*. **BMC Veterinary Research**, [s.l.], v. 17, n. 1, p. 107, 5 dez. 2021.

CHIRCOV, C. et al. Biosensors-on-Chip: An Up-to-Date Review. **Molecules**, [s.l.], v. 25, n. 24, 1 dez. 2020.

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

COSTA, M. et al. Principais Micro-organismos Responsáveis por Infecções Relacionadas à Assistência em Saúde (IRAS) em Utis: Uma Revisão Integrativa. **Revista Eletrônica da Faculdade Evangélica de Ceres**, [s.l.], v. 8, n. 1, 27 mar. 2019.

DENISSEN, J. et al. Prevalence of ESKAPE pathogens in the environment: Antibiotic resistance status, community-acquired infection and risk to human health. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, Elsevier GmbH, [s.l.], v. 244, p. 114006, 1 jul. 2022.

DZULKURNAIN, N. A. et al. A review on impedimetric and voltammetric analysis based on polypyrrole conducting polymers for electrochemical sensing applications. **Polymers**, MDPI AG, [s.l.], v. 13, n. 16, p. 2728, 2 ago. 2021.

ELGRISHI, N. et al. A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry. **Journal of Chemical Education**, [s.l.], v. 95, n. 2, p. 197–206, 13 fev. 2018.

FARZIN, M. A. et al. AuNP-based biosensors for the diagnosis of pathogenic human coronaviruses: COVID-19 pandemic developments. **Analytical and Bioanalytical**

Chemistry, Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, [s.l.], v. 414, n. 24, p. 7069- 7084, 2022.

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

GARCIA-MELO, L. F. et al. Development of a Nanostructured Electrochemical Genosensor for the Detection of the K-ras Gene. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, [s.l.], v. 2022, p. 1-12, 2022.

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

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

GRIESHABER, D. et al. Electrochemical Biosensors-Sensor Principles and Architectures. **Sensors**, [s.l.], v. 8, p. 1400–1458, 2008.

GUO, H. et al. Development of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of Osmotolerant yeast *Zygosaccharomyces Rouxii* in different food. **Food and Agricultural Immunology**, [s.l.], v. 29, n. 1, p. 976–988, 1 jan. 2018.

HAMMOND, J. L. et al. Electrochemical biosensors and nanobiosensors. **Essays in Biochemistry**, [s.l.], v. 60, n. 1, p. 69–80, 30 jun. 2016.

HAO, L. et al. Polypyrrole Nanomaterials: Structure, Preparation and Application. **Polymers**, MDPI, [s.l.], v. 12, n. 12, p. 1171, 1 dez. 2022.

HESSELS, A. J.; KUO, Y. H.; AHMED, N. Epidemiology and Impact of Healthcare-Associated Infections in Trauma Patients: A National Data Analysis. **Surgical Infections**, v. 21, n. 10, p. 871–876, 1 dez. 2020.

HOYOS-NOGUÉS, M.; GIL, F. J.; MAS-MORUNO, C. Antimicrobial peptides: Powerful biorecognition elements to detect bacteria in biosensing technologies. **Molecules**, [s.l.], v. 23, n. 7, 2018.

JACKSON, N. et al. A multiplexed, indirect enzyme-linked immunoassay for the detection and differentiation of *E. coli* from other Enterobacteriaceae and *P. aeruginosa* from other glucose non-fermenters. **Journal of Microbiological Methods**, [s.l.], v. 158, p. 52–58, 1 mar. 2019.

KARACHALIOU, C. E. et al. Cortisol Immunosensors: A Literature Review. **Biosensors**, MDPI, [s.l.], v. 13, n 2, 1 fev. 2023.

KARUNAKARAN, C. et al. Introduction to Biosensors. Em: **Biosensors and Bioelectronics**. Elsevier Inc., [s.l.], p. 1–68, 2015.

KIFFER, C. R. V et al. Exploratory model for estimating occupation-day costs associated to Hospital Related Infections based on data from national prevalence project: IRAS Brasil Project on behalf of the IRAS Brasil group COMUNICAÇÃO BREVE. **Journal of Infection Control**, [s.l.], v. 4, n. 1, p. 30–33, 2015.

KIM, J. et al. Wearable biosensors for healthcare monitoring. **Nature Biotechnology**, Nature Publishing Group, [s.l.], v. 37, n. 4, p. 389-406, 1 abr. 2019.

KIM, S.; YOO, H. Self-assembled monolayers: Versatile uses in electronic devices from gate dielectrics, dopants, and biosensing linkers. **Micromachines**, MDPI AG, [s.l.], v. 12, n. 5, p. 565, 2021.

KUMAR, P. et al. Antimicrobial peptides: Diversity, mechanism of action and strategies to improve the activity and biocompatibility in vivo. **Biomolecules**, MDPI AG, [s.l.], v. 8, n. 1, p. 4, 1 mar. 2018.

LAZZARO, B. P. et al. Antimicrobial peptides: Application informed by evolution. **Science**, American Association for the Advancement of Science, [s.l.], v. 368, n. 6490, 1 maio 2020.

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

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

LEMIECH-MIROWSKA, E. et al. Nosocomial infections as one of the most important problems of the healthcare system. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, Institute of Agricultural Medicine, [s.l.], v. 28, n. 3, p. 361-366, 2021.

LEONCIO, J. M. et al. Impact of healthcare-associated infections on the hospitalization costs of children. **Revista da Escola de Enfermagem**, [s.l.], v. 53, 2019.

LEVA-BUENO, J. at al. A review on impedimetric immunosensors for pathogen and biomarker detection. **Medical Microbiology and Immunology**, Springer, [s.l.], v. 209, n. 3, p. 343-362, 1 jun. 2020.

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

LIANG, S. et al. Giant Magnetoresistance Biosensors for Food Safety Applications. **Sensors**, MDPI, [s.l.], v. 22, n. 15, p. 5663, 1 ago. 2022.

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

MABROUK, M. et al. Nanomaterials for biomedical applications: Production, characterisations, recent trends and difficulties. **Molecules**, MDPI AG, [s.l.], v. 26, n. 4, 1 fev. 2021.

MAGILL, S. S. et al. Changes in Prevalence of Health Care–Associated Infections in U.S. Hospitals. **New England Journal of Medicine**, [s.l.], v. 379, n. 18, p. 1732–1744, nov. 2018.

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

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

MARTINS, C. R. F. et al. **Técnica de Coloração de GRAM**. Brasília: [s.n.]. Disponível em: <https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwiB7OvLnoOBAXUEA9QKHe5NCalQFnoECC8QAQ&url=http%3A%2F%2Fbvsms.saude.gov.br%2Fbvs%2Fpublicacoes%2F115_03gram.pdf&usg=AOvVaw0xKxyHSKgfZCmmkThqm9u1&opi=89978449>. Acesso em: 29 ago. 2023.

MENESES, Henrique Pereira Andrade. **Sensores eletroquímicos empregados na detecção de doenças negligenciáveis**. Monografia (Graduação em Química) - Universidade Federal de São João del-Rei. Minas Gerais, p. 36. 2018.

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

MOHAMAD, N. A. et al. Bacteria Identification From Microscopic Morphology: A Survey. **International Journal on Soft Computing, Artificial Intelligence and Applications**, [s.l.], v. 3, n. 2, p. 1–12, 30 maio 2014.

MORAES, L. F. R. N. et al. First generation of multifunctional peptides derived from latarcin-3a from *Lachesana tarabaei* spider toxin. **Frontiers in Microbiology**, [s.l.], v. 13, 21 set. 2022.

MOROSINI, M. I. et al. Changes in bacterial hospital epidemiology. **Revista espanola de quimioterapia : publicacion oficial de la Sociedad Espanola de Quimioterapia**, [s.l.], v. 31, n. 1, p. 23–26, set. 2018.

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

MWANGI, J. et al. Antimicrobial peptides: new hope in the war against multidrug resistance. **Zoological research**, NLM (Medline), [s.l.], v. 40, n. 3, 18 nov. 2019.

NAVAEE, A. et al. Enzyme-based electrochemical biosensors. Em: **Electrochemical Biosensors**. Elsevier, [s.l.], p. 167–211, 2019.

NG, S.; OV, G. Microbial Identification Methods in Pharmaceutical Analysis: Comparison and Evaluation. **Mathews Journal of Pharmaceutical Science**, [s.l.], v. 1, n. 1, 12 fev. 2016.

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

OMS. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Global report on infection prevention and control**. Genebra: [s.n.], 2022.

PACHECO, W. F. et al. Voltammetry: A brief review about concepts. **Revista Virtual de Química**, Sociedade Brasileira de Química, [s.l.], v. 5, n. 4, p. 516-537, 2013.

PADOVEZE, M. C.; FORTALEZA, C. M. C. B. Healthcare-associated infections: Challenges to public health in Brazil. **Revista de Saúde Pública**, [s.l.], v. 48, n. 6, p. 995–1001, 2014.

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

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

PARK, M. Surface display technology for biosensor applications: A review. **Sensors (Switzerland)**, MDPI AG, [s.l.], v. 20, n. 10, 2 maio 2020.

PERANTONI, L. M.; QUEIROZ-FERNANDES, G. M. DE. Evolução das Técnicas Diagnósticas em Microbiologia Clínica. **Salusvita, Bauru**, [s.l.], v. 38, n. 2, p. 529–542, 2019.

PIROOZMAND, F. et al. Emerging biosensors in detection of natural products. **Synthetic and Systems Biotechnology**, KeAi Communications Co., [s.l.], v. 5, n. 4, p. 293-303, 1 dez. 2020.

RAMESH, M. et al. Nanotechnology-Enabled Biosensors: A Review of Fundamentals, Design Principles, Materials, and Applications. **Biosensors**, MDPI, [s.l.], v. 13, n. 1, 1 jan. 2023.

RAVEA, A. F. G. et al. Biochemical identification techniques and antibiotic susceptibility profile of lipolytic ambiental bacteria from effluents. **Brazilian Journal of Biology**, [s.l.], v. 79, n. 4, p. 555–565, 1 nov. 2019.

REGHU, R.; VIJAYAN, M.; KRISHNAN, S. Nosocomial Infections-an Overview. **International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences** [s.l.], v. 4, n. 2, p. 291–297, 2014.

RICCI, F. et al. A review of experimental aspects of electrochemical immunosensors. **Electrochimica Acta**, [s.l.], v. 84, p. 74-83, 1 dez. 2012.

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

RONKAINEN, N. J.; HALSALL, H. B.; HEINEMAN, W. R. Electrochemical biosensors. **Chemical Society Reviews**, [s.l.], v. 39, n. 5, p. 1747–1763, 26 abr. 2010.

ROSAS-LAVERDE, N. M. et al. Graphene oxide-polypyrrole coating for functional ceramics. **Nanomaterials**, [s.l.], v. 10, n. 6, p. 1–13, 1 jun. 2020.

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

SHOAIB, M. et al. A Mini-Review on Commonly used Biochemical Tests for Identification of Bacteria. **International Journal of Research Publications**, [s.l.], v. 54, n. 1, 15 jun. 2020.

SILVA JUNIOR, A. G. et al. A simple nanostructured impedimetric biosensor based on clavanin a peptide for bacterial detection. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, [s.l.], v. 255, p. 3267–3274, 1 fev. 2018.

SILVA JUNIOR, A. G. et al. Concanavalin A differentiates gram-positive bacteria through hierarchized nanostructured transducer. **Microbiological Research**, [s.l.], v. 251, 1 out. 2021.

SILVA JUNIOR, A. G. et al. Electrochemical detection of gram-negative bacteria through mastoparan-capped magnetic nanoparticle. **Enzyme and Microbial Technology**, [s.l.], v. 160, p. 110088, 2022.

SILVA JUNIOR, Alberto Galdino. **Desenvolvimento de biodispositivos a partir de moléculas bioinspiradas do Pantanal para aplicações em microrganismos**. Tese (Doutorado em Inovação Terapêutica) - Universidade Federal de Pernambuco. Recife, p. 270. 2021.

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

SILVA, P. F.; PADOVEZE, M. C. **Infecções Relacionadas a Serviços De Saúde - Orientação para Público em Geral. Conhecendo um pouco mais sobre infecção**. São Paulo: [s.n.]. Disponível em: <http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/infeccao-hospitalar/doc/iras12_pub_geral.pdf>. Acesso em: 24 ago. 2023.

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

SONAWANE, G. G.; et al. Comparison of a quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) with conventional PCR, bacterial culture and ELISA for detection of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis infection in sheep showing pathology of Johne's disease. **SpringerPlus**, [s.l.], v. 2, n. 1, p. 45, 11 dez. 2013.

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

STORR, J. et al. Core components for effective infection prevention and control programmes: New WHO evidence-based recommendations. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, [s.l.], v. 6, n. 1, 10 jan. 2017.

SU, H. et al. Potential applications and human biosafety of nanomaterials used in nanomedicine. **Journal of Applied Toxicology**, John Wiley and Sons Ltd, [s.l.], v. 38, n. 1, p. 3-24, 1 jan. 2018.

SU, L. et al. Microbial biosensors: A review. **Biosensors and Bioelectronics**, [s.l.], v. 26, n. 5, p. 1788 – 1799, 15 jan. 2011.

TENE, T. et al. Drying-Time Study in Graphene Oxide. **Nanomaterials**, [s.l.], v. 11, n. 4, p. 1035, 19 abr. 2021.

TERTIS, M. et al. Electrochemical peptide-based sensors for foodborne pathogens detection. **Molecules**, MDPI AG, [s.l.], v. 26, n. 11, 1 jun. 2021.

THE WORLD BANK. **By 2050, drug-resistant infections could cause global economic damage on par with 2008 financial crisis**. Disponível em: <<https://www.worldbank.org/en/news/press-release/2016/09/18/by-2050-drug-resistant-infections-could-cause-global-economic-damage-on-par-with-2008-financial-crisis>>. Acesso em: 19 ago. 2023.

ULLAH, R. et al. Preparation of Electrochemical Supercapacitor Based on Polypyrrole/Gum Arabic Composites. **Polymers**, [s.l.], v. 14, n. 2, p. 242, 7 jan. 2022.

UNGUREANU, C. et al. Metallic and Metal Oxides Nanoparticles for Sensing Food Pathogens—An Overview of Recent Findings and Future Prospects. **Materials**, MDPI, [s.l.], v. 15, n. 15, p. 5374, 1 ago. 2022.

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

WANG, P. et al. Optical Methods for Label-Free Detection of Bacteria. **Biosensors**, [s.l.], v. 12, n. 12, p. 1171, 15 dez. 2022.

WATTAL, C. et al. **Neonatal Sepsis: Mortality and Morbidity in Neonatal Sepsis due to Multidrug-Resistant (MDR) Organisms: Part 1. Indian Journal of Pediatrics**Springer, [s.l.], v. 87, n. 2, p. 117- 121, 1 fev. 2020.

YANG, J. et al. Recent Advances in Colorimetric Sensors Based on Gold Nanoparticles for Pathogen Detection. **Biosensors**, MDPI, [s.l.], v. 13, n. 1, p. 29, 1 jan. 2023.

ZAMZAMI, M. et al. Direct Identification of Label-Free Gram-Negative Bacteria with Bioreceptor-Free Concentric Interdigitated Electrodes. **Biosensors**, [s.l.], v. 13, n. 2, p. 179, 1 fev. 2023.

ZHANG, M. et al. An interactive nomogram to predict healthcare-associated infections in ICU patients: A multicenter study in GuiZhou Province, China. **PLoS ONE**, [s.l.], v. 14, n. 7, 1 jul. 2019.

ZHAO, W. W.; XU, J. J.; CHEN, H. Y. Photoelectrochemical enzymatic biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, Elsevier Ltd, [s.l.], v. 92, p. 294-304, 15 jun. 2017.

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