



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

LEANDRO ARAÚJO DA COSTA

BIOSENSOR IMPEDIMÉTRICO BASEADO EM NANOPARTÍCULAS DE CoFe_2O_4
ACOPLADAS A CONCAVALINA A PARA DETECÇÃO DE *E. COLI*

FORTALEZA

2022

LEANDRO ARAÚJO DA COSTA

BIOSSENSOR IMPEDIMÉTRICO BASEADO EM NANOPARTÍCULAS DE CoFe_2O_4
ACOPLADAS A CONCAVALINA A PARA DETECÇÃO DE *E. COLI*

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química. Área de concentração: Química Inorgânica.

Orientadora: Prof^a Dr^a Izaura Cirino Nogueira Diógenes

Coorientador: Prof. Dr. Tércio de Freitas Paulo

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará

Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

A69

Costa, Leandro Araújo da.

Biossensor impedimétrico baseado em nanopartículas de CoFe_2O_4 acopladas a concanavalina a para detecção de *E. coli* / Leandro Araújo da Costa. – 2022.

72 f. : il. color.

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

Orientação: Profa. Dra. Izaura Cirino Nogueira Diógenes.

Coorientação: Prof. Dr. Tércio de Freitas Paulo.

1. Nanopartículas. 2. CoFe_2O_4 . 3. Biossensor. 4. Detecção de bactérias. 5. *E. coli*. I. Título.

CDD 540

LEANDRO ARAÚJO DA COSTA

BIOSSENSOR IMPEDIMÉTRICO BASEADO EM NANOPARTÍCULAS DE CoFe_2O_4
ACOPLADAS A CONCAVALINA A PARA DETECÇÃO DE *E. COLI*

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química. Área de concentração: Química Inorgânica.

Aprovada em 15/07/2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dra. Izaura Cirino Nogueira Diógenes (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Adonay Rodrigues Loiola
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof.^a Dra. Maria Aparecida Santiago da Silva
Instituto Federal do Ceará (IFCE)

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Profa. Dra. Izaura Cirino Nogueira Diógenes pelo grande incentivo a pesquisa durante todo o meu período na universidade, que me acompanha desde a Iniciação Científica até o Mestrado. Por meio da sua excelente orientação e direcionamentos adquiri muitos conhecimentos para a minha formação profissional, graças a sua dedicação, paciência, compreensão e confiança no meu trabalho. Sendo dessa forma uma profissional que tenho bastante respeito e admiração.

Ao Prof. Dr. Tércio de Freitas Paulo pela sua coorientação, contribuindo de forma direta nesse trabalho desde o início do meu Mestrado com todas as suas críticas, sugestões e conhecimentos transmitidos.

Agradeço a todos os membros da banca examinadora pela disposição em avaliar e contribuir com esse trabalho.

À Dra. Maria Aparecida Santiago da Silva, que me acompanhou durante a Iniciação Científica contribuindo enormemente na minha formação. Devo a ela todo conhecimento que obtive acerca de síntese e caracterização de nanopartículas, tendo contribuído na fase inicial desse trabalho.

Agradeço a todos do Laboratório de Bioinorgânica, que contribuíram para a minha formação durante o Mestrado, em especial ao Wellinson Gadêlha e Vitória Dibo que me ajudaram na parte da metodologia de crescimento das bactérias *E. coli*. A Vitória Dibo, que também me auxiliou na parte de eletroquímica, instrumental e tratamento dos dados de VC e EIS, e me ensinou a parte de limpeza do eletrodo de ouro. E também aos colegas Suesley, Henrique e Karolina pela ajuda e sugestões em diversos momentos.

Ao Laboratório de Polímeros da UFC por me permitir o acesso ao equipamento Zeta Sizer, no qual obtive os resultados de DLS. E ao Laboratório de Raios X da UFC, pelas análises de DRX.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Química da UFC e todos que trabalham na sua administração. Aos órgãos de fomento CAPES e CNPq, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de estudos. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

À toda a minha família e em especial a minha mãe Cláudia Araújo da Costa por toda a dedicação e carinho.

RESUMO

A detecção rápida e precisa de bactérias patogênicas em instalações de ponto de atendimento, particularmente em países em desenvolvimento é uma questão emergente na indústria alimentícia e medicinal. Nesse contexto, os biossensores eletroquímicos e impedimétricos têm surgido como uma ferramenta poderosa devido ao baixo custo, limites de detecção e sensibilidade, onde as nanopartículas (NPs) podem ser empregadas na modificação de eletrodos para aumentar a área superficial e, conseqüentemente, a sensibilidade. Este trabalho apresenta os resultados obtidos para um biossensor impedimétrico construído sobre uma monocamada de cisteína (Cys) sobre ouro contendo NPs de CoFe_2O_4 e a lectina *concanavalina A* (ConA) objetivando a detecção de *Escherichia coli* (*E. coli*). Previamente às etapas de modificação, as NPs de CoFe_2O_4 foram sintetizadas e funcionalizadas com 3-aminopropiltriétoxissilano (APTES) para fornecer extremidades com $-\text{NH}_2$ ($\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{NH}_2$). As moléculas de cisteína sobre ouro foram ativadas com agentes de reticulação formando a superfície Au/Cys/NHS que, por sua vez, foi imersa em suspensão aquosa de NPs de $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{NH}_2$ produzindo o eletrodo Au/Cys/NPs. Na etapa seguinte, esse eletrodo foi imerso em solução contendo ConA formando o biossensor Au/Cys/NPs/ConA. Cada etapa de modificação foi monitorada por espectroscopia de impedância eletroquímica e voltametria cíclica em solução contendo $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. Os valores de resistência de transferência de carga (R_{CT}) obtidos a partir dos diagramas de Nyquist aumentaram em cada etapa variando de 50,43 para 532,56 $\Omega \text{ cm}^2$ para as superfícies Au/Cys/NPs e Au/Cys/NPs/ConA, respectivamente, mostrando o bloqueio da superfície em relação às espécies redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ após imobilização da lectina. O efeito de bloqueio foi observado de forma ainda mais intensa em solução contendo a bactéria *E. coli* e apresentou dependência com a concentração desta espécie permitindo, assim, a utilização do biossensor Au/Cys/NPs/ConA para detecção de *E. coli* em uma faixa linear de $1,7 \times 10^1$ a $8,3 \times 10^4$ UFC/mL e com um limite de detecção (LOD) de $0,2 \times 10^{-3}$ UFC/mL após apenas 15 min de contato. O baixo valor de LOD foi atribuído à combinação das propriedades nanométricas das NPs de $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{NH}_2$ com a afinidade da lectina ConA por lipopolissacarídeos presentes nas paredes celulares das bactérias. Comparativamente a sistemas reportados na literatura para bactérias gram-negativas, o valor de LOD determinado neste trabalho indica a produção de um biossensor impedimétrico rápido e de baixo limite de detecção para detecção de *E. coli*.

Palavras-chave: nanopartículas; CoFe_2O_4 ; biossensor, detecção de bactérias; *E. coli*.

ABSTRACT

Rapid and accurate detection of pathogenic bacteria in point-of-care facilities, particularly in developing countries, is an emerging issue in food and medical industry. In this context, electrochemical and impedimetric biosensors have emerged as a powerful tool due to their low-cost, detection limits and sensitivity, where nanoparticles (NPs) can be used to modify electrodes to increase their surface area thus improving the sensitivity. This work presents the results obtained for a impedimetric biosensor built on a monolayer of cysteine (Cys) on gold containing NPs of CoFe_2O_4 and the lectin *concanavalina A* (ConA) aiming the detection of *Escherichia coli* (*E. coli*). Previously to the modification steps, the CoFe_2O_4 NPs were synthesized and functionalized with (3-aminopropyl)triethoxysilane (APTES) to provide NH_2 ends ($\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{NH}_2$). The cysteine molecules on gold were activated with crosslinking agents producing Au/Cys/NHS that, in turn, was immersed in an aqueous solution of $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{NH}_2$ forming Au/Cys/NPs. In the following step, this electrode was immersed in a solution containing Con A generating Au/Cys/NPs/ConA. Each modification step was monitored by electrochemical impedance spectroscopy and cyclic voltammetry in solution containing $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. The values of charge transfer resistance (R_{CT}) obtained from the Nyquist diagrams increased in each step varying from 50.43 to 532.56 $\Omega \text{ cm}^2$ for the Au/Cys/NPs and Au/Cys/NPs/ConA, respectively, showing the surface blockage in respect to the $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ redox species after the lectin immobilization. The blockage effect was even stronger in solution containing *E. coli* and showed a concentration dependence on this bacterium. Such dependence allowed the use of the biosensor Au/Cys/NPs/ConA for detecting *E. Coli* within a linear range from 1.7×10^1 to 8.3×10^4 UFC/mL with an estimated limit of detection (LOD) of 0.2×10^{-3} UFC/mL after just 15 min of exposure. This low value of LOD was assigned to the combination of the nanometric properties of the $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{NH}_2$ NPs with the affinity of the ConA lectin for lipopolysaccharides on the cell wall of the bacterias. In comparison to other systems reported in the literature for gram-negative bacteria, the LOD value determined in this work indicates the production of an impedimetric biosensor fast and of low detection limit for the detection of *E. coli*.

Keywords: nanoparticles; CoFe_2O_4 ; biosensor; bacteria detection; *E. coli*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Diagrama esquemático geral mostrando os principais componentes de um biossensor eletroquímico típico	14
Figura 2	– Representação geral de um gráfico de Nyquist mostrando o semicírculo e as regiões controladas por cinética e transferência de massa. R_s : resistência da solução; R_{ct} : resistência à transferência de carga; C_{dl} : capacitância máxima da dupla camada; W : impedância de Warburg	15
Figura 3	– Esquema genérico de impedância para cada etapa de construção de um biossensor. (a) eletrodo de ouro (Au) funcionalizado, (b) biorreceptores são imobilizados na superfície e (c) ocorre a imobilização de um analito de interesse	16
Figura 4	– Ilustração dos componentes de um biossensor eletroquímico para detecção de bactérias oriundas de alimentos	18
Figura 5	– (A) Estrutura tridimensional do monômero da Concanavalina A e (B) atração entre lectinas e os carboidratos presentes na superfície microbiana. As linhas tracejadas mostram as forças atrativas de ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e eletrostáticas	24
Figura 6	– Modelo esquemático da interação de lectinas Concanavalina A com LPS da superfície celular de bactérias Gram-negativas	25
Figura 7	– Esquema geral das etapas de modificação do eletrodo para detecção de <i>E. coli</i>	26
Figura 8	– Estrutura do ácido oleico (A) e da oleilamina (B) utilizados na síntese das NPs	29
Figura 9	– Estrutura do composto 3-aminopropiltriétoxissilano (APTES) usado para o revestimento das NPs	30
Figura 10	– Figura 10 - (A) Esquema das reações de hidrólise e condensação do APTES em meio ácido e (B) troca dos ligantes de ácido oleico na superfície da NPs de $CoFe_2O_4$ pelo silano APTES	31
Figura 11	– Voltamograma cíclico a 100 mVs^{-1} do eletrodo de ouro policristalino em solução $0,5\text{ mol L}^{-1}$ de H_2SO_4 a $25\text{ }^\circ\text{C}$	35
Figura 12	– Etapas de modificação do eletrodo de ouro com cisteína (Cys), N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida hidrocloreto (EDC) e N-hidroxissulfosuccinimida (NHS), NPs $CoFe_2O_4@NH_2$ e ConA para a	36

formação do eletrodo Au/Cys/NHS/NPs/ConA	
Figura 13 – Esquema da reação de reticulação carboxil-amina usando o EDC e NHS	37
Figura 14 – Difratoograma de raios X para a amostra de NPs de CoFe_2O_4 incluindo os perfis calculado (vermelho), observado (preto) e a diferença entre ambos (azul)	38
Figura 15 – Estrutura cristalina das NPs CoFe_2O_4 , (a) modelo de bola e bastão onde as esferas pequenas representam os átomos de oxigênio e as esferas grandes representam os átomos de cobalto ou ferro; (b) modelo poliédrico contendo os sítios tetraédricos e octaédricos dentro da estrutura cristalina	40
Figura 16 – Imagens de MET das NPs CoFe_2O_4 (A) e $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{NH}_2$ (B)	41
Figura 17 – Gráficos de distribuição de tamanhos para as NPs CoFe_2O_4 (A) e $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{NH}_2$ (B)	42
Figura 18 – Gráfico da distribuição percentual do número de partículas em função de D_H para as NPs (A) CoFe_2O_4 e (B) $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{NH}_2$	43
Figura 19 – Espectros vibracionais na região do infravermelho das amostras CoFe_2O_4 e $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{NH}_2$ obtidos em pastilha de KBr	45
Figura 20 – Voltamogramas cíclicos do eletrodo de ouro modificado com NPs $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{NH}_2$ e ConA e após imersão por 15 min em solução contendo <i>E. coli</i> ($8,3 \times 10^4$ UFC/mL). Curvas obtidas a $0,05 \text{ V s}^{-1}$ em solução de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ contendo $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$	49
Figura 21 – Diagramas de Nyquist para cada etapas de modificação do eletrodo e após imersão em solução contendo <i>E. coli</i> ($8,3 \times 10^4$ UFC/mL). Solução $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl contendo $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Inserido: diagramas de Nyquist aumentado para Au, Au/Cys, Au/Cys/NHS e Au/Cys/NHS/NPs	51
Figura 22 – Diagramas de Nyquist obtidos para o eletrodo Au/Cys/NHS/NPs/ConA e deste após 15 min de imersão em soluções de diferentes concentrações de <i>E. coli</i> . Solução $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl contendo $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$	51
Figura 23 – Curva de calibração do biosensor Au/Cys/NHS/NPs/ConA em contato com soluções de <i>E. coli</i>	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Comparação entre parâmetros de rede obtidos no refinamento e os de referência	39
Tabela 2 – Tentativa de atribuição dos principais modos vibracionais observados para as NPs CoFe_2O_4 e $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{NH}_2$	46
Tabela 3 – Parâmetros impedimétricos e voltamétricos obtidos para o íon complexo $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ em função da superfície modificada e concentração de <i>E. coli</i>	52
Tabela 4 – Comparação entre biossensores eletroquímicos para detecção de patógenos. Abreviações: espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS), voltametria cíclica (VC), bactérias redutoras de sulfato (BRS), unidade formadora de colônia (UFC)	57

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	OBJETIVOS	26
2.1	Objetivo geral	26
2.2	Objetivos específicos	27
3	METODOLOGIA	28
3.1	Reagentes	28
3.2	Síntese das nanopartículas de CoFe₂O₄	28
3.3	Revestimento das NPs de CoFe₂O₄ com APTES	30
3.4	Técnicas de caracterização das NPs	32
3.5	Medidas eletroquímicas	33
3.5.1	<i>Pré-tratamento da superfície de ouro</i>	33
3.5.2	<i>Determinação da área ativa do eletrodo de ouro</i>	33
3.5.3	<i>Modificação do eletrodo de ouro</i>	35
3.5.4	<i>Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE)</i>	37
3.5.5	<i>Detecção das bactérias E. coli</i>	37
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1	Difração de Raios X	38
4.2	Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	41
4.3	Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)	43
4.4	Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho (IV)	45
4.5	Modificação do eletrodo de ouro e detecção de E. coli	48
5	CONCLUSÕES	59
	REFERÊNCIAS	61
	ANEXO A – IMAGENS DE MET DAS NPS EM MAIOR ESCALA	72

1 INTRODUÇÃO

A detecção eficaz de patógenos é uma etapa fundamental para garantir a segurança alimentar e manter a saúde pública, tendo em vista a rápida disseminação de bactérias patogênicas que causam doenças pela ingestão de alimentos e água contaminada (KOTSIRI; VIDIC; VANTARAKIS, 2022; WANG; RAVINDRANATH; IRUDAYARAJ, 2011). No decorrer do tempo, a saúde humana foi afetada, constantemente, por infecções decorrentes de bactérias. A maioria das fontes de água está contaminada com cepas bacterianas que são patogênicas como, por exemplo, *Escherichia coli* (*E. Coli*), *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella*, que resultam em febre tifóide, coléra, gastroenterite e várias doenças diarreicas agudas. Esses patógenos têm tendência de causar sintomas que, por vezes, necessitam de hospitalização. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), dados de 2016 (RAZMI et al., 2020) indicam a ocorrência de 829000 mortes anuais por diarreia em decorrência de contaminação bacteriana após ingestão de água. Além disso, aproximadamente 600 milhões (quase 1 em cada 10 pessoas no mundo) adoecem por causa do consumo de alimentos contaminados, resultando em 420000 mortes anuais (CASTLE et al., 2021; BALAKRISHNAN et al., 2016). Algumas cepas dessas bactérias, por sua vez, são resistentes a antibióticos o que tem levado à busca de novas técnicas para isolamento e detecção de microrganismos em conjunto com melhorias na segurança alimentar, diagnóstico médico e qualidade da água (KEARNS et al., 2017).

Dados de 2014 da OMS (MURRAY et al., 2022) revelam que 700000 mortes por ano no mundo, foram devidas às infecções resistentes a antibióticos e essa estimativa tende a permanecer a mesma até o presente ano. O Brasil contribui com cerca de 20000 dessas mortes por ano. A perspectiva, infelizmente, é de 10 milhões de mortes decorrentes de infecções resistentes a antibióticos no mundo inteiro até o ano de 2050 (FURST; FRANCIS, 2019). Uma pesquisa publicada este ano (2022), realizada em nível global, mostra resultados preocupantes na medida em que revela que cerca de 1,27 milhão de pessoas morreram em 2019 devido às infecções bacterianas resistentes aos antibióticos (MURRAY et al., 2022). A projeção desse número para 2050 indica uma quantidade bem superior de mortes que o previsto. Os seis principais patógenos que causaram mortes associadas a resistência a antibióticos foram: *E. coli*, seguido por *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*,

Streptococcus pneumoniae, *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* (MURRAY et al., 2022).

Ainda sobre os dados de 2019, as maiores taxas de mortalidade estão na África Subsaariana e no sul da Ásia ocorrendo, principalmente, devido à carência de infraestrutura laboratorial que tornam indisponíveis os testes microbiológicos para um diagnóstico precoce, além da falta de saneamento básico e higiene. Acrescente-se a esses fatores, a grave questão de falsificação de antibióticos que podem criar resistência (COLLIGNON et al., 2018; RAMAY et al., 2020; UNAL, 2018). Dentre as síndromes infecciosas que causaram mortes por resistência, as infecções das vias respiratórias inferiores foram responsáveis pelo maior número de óbitos (400000 mortes atribuídas) e a *S. aureus* resistente à metilina foi a combinação patógeno-droga analisada com maior número de óbitos atribuíveis à resistência (100000 mortes) (MERA et al., 2011; MURRAY et al., 2022).

Dentre as principais bactérias que causam a morte por resistência a antibióticos, a *E. coli* foi escolhida como foco desse trabalho, por ser de fácil manuseio no laboratório permitindo a associação e comparação com outras bactérias gram-negativas. Essa bactéria tem sido usada, frequentemente, como um indicador padrão de coliformes fecais na água e pode ser encontrada no intestino humano e em outros animais de sangue quente, sendo normalmente inofensiva para humanos (RAMANUJAM et al., 2021; RAZMI et al., 2020). Porém, algumas cepas de *E. coli* patogênicas podem causar doenças diarreicas agudas como, por exemplo, a *E. coli* enterohemorrágica (EHEC). O patógeno EHEC mais grave é a *E. coli* O157:H7 devido à sua propriedade de causar diarreia sanguinolenta, provocando a síndrome hemolítico-urêmica (SHU) que pode ser fatal (BALAKRISHNAN et al., 2016; RAZMI et al., 2020). A sua transmissão acontece, principalmente, através do consumo de alimentos, tais como vegetais, carnes, leite e fontes de água que estiveram em contato com matéria fecal (BANERJEE et al., 2016; ETCHEVERRÍA; PADOLA, 2013). Uma dose de ingestão de 10 a 100 células de *E. coli* O157:H7 (RAZMI et al., 2020), além de SHU, pode causar insuficiência respiratória, anemia, convulsões, doença gastrointestinal, colite hemorrágica, insuficiência renal aguda, e a morte, especialmente em lactentes e pessoas imunocomprometidas (TARDITTO et al., 2016; CHEN et al., 2016).

A bactéria *E. coli* é um enorme desafio à saúde pública em relação aos custos médicos, por ser extremamente infecciosa e de origem hídrica e alimentar. O Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) estima que 20000 doenças anuais são decorrentes de

infecção por *E. coli* O157:H7 (MALVANO; PILLOTON; ALBANESE, 2018). Tendo em vista várias doenças que são provenientes de bactérias e as taxas crescentes de resistência aos antibióticos que levam a óbito, principalmente, em países subdesenvolvidos, tem-se a importância de estudar novas formas para detecção (FURST; FRANCIS, 2019). Sendo assim, uma tarefa indispensável nas áreas de diagnóstico clínico, monitoramento ambiental e segurança alimentar é a determinação e quantificação de bactérias através de um método que seja rápido, seletivo, preciso, sensível e fácil de usar (RAZMI et al., 2020).

Os métodos existentes para detecção de bactérias patogênicas apresentam sensibilidade, podendo detectar os microrganismos de forma qualitativa e quantitativa. Alguns dos mais comuns são: cultura de placas, reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*) e ensaio imunoenzimático (ELISA, do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Esses métodos, porém, apresentam algumas desvantagens que os encarecem. O método convencional de cultura em placas exige procedimentos trabalhosos e demanda um tempo longo para obter resultados. Já o PCR necessita de um equipamento específico e demanda tempo e pessoal treinado para a manipulação. O ELISA é uma técnica imunológica que utiliza uma enzima para a detecção de um anticorpo ou antígeno como resposta à presença microbiana em uma amostra. Essa técnica exige etapas de enriquecimento ou pré-concentração, purificação e pré-tratamentos que prologam o tempo de análise (KEARNS et al., 2017; RAZMI et al., 2020). Por esses motivos, nos últimos 25 anos, a tecnologia de biossensores tem recebido grande destaque podendo apresentar resultados com sensibilidade e confiabilidade equiparados aos métodos convencionais, além de tempos de análise mais curtos (KAYA et al., 2021; VELUSAMY et al., 2010). Sendo necessário cada vez mais pesquisas visando a redução do limite de detecção e tempo de resposta, além de estratégias para miniaturizar esses dispositivos em um formato que seja portátil, oferecendo assim a vantagem de ser utilizado para detecção no ponto de atendimento (CESEWSKI; JOHNSON, 2020).

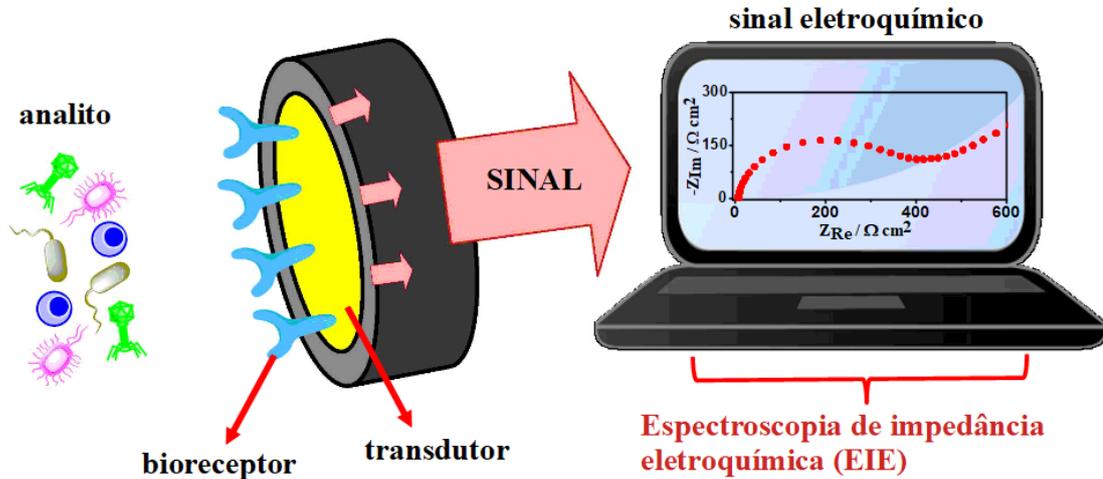
Os patógenos que são transmitidos por alimentos e água são responsáveis por mais de 9,4 milhões de doenças todos os anos dos Estados Unidos (RIU; GIUSSANI, 2020). Por ser um problema em escala mundial, tem-se a exigência de sensores rápidos para detecção em alimentos e água no ponto de atendimento e os biossensores eletroquímicos apresentam vantagens em relação aos ensaios convencionais de laboratório, com custo reduzido, simplicidade, maior velocidade, seletividade, sensibilidade e especificidade. Os biossensores

vêm sendo bastante utilizados para o monitoramento e detecção de bactérias pela facilidade das medidas e compatibilidade com soluções complexas, como água e bebidas no local de atendimento e em tempo real, apresentando potencial para serem aplicados na indústria alimentícia, agricultura, setor de saúde, tratamento de água e análise de água (KOTSIRI; VIDIC; VANTARAKIS, 2022; FURST; FRANCIS, 2019). Além das bactérias, que são os principais patógenos detectados usando biossensores eletroquímicos nos últimos 7 anos (CESEWSKI; JOHNSON, 2020), a detecção de vírus e protozoários também vem sendo cada vez mais estudada.

O primeiro biossensor reportado foi apresentado em 1962 por Clark e Lyons para medição dos níveis de glicose (CLARK; LYONS, 1962). A publicação gerou interesse no meio científico e ao decorrer dos anos os biossensores foram desenvolvidos e aperfeiçoados para se converterem em um instrumento analítico sensível, rápido, portátil e de baixo custo (YOO; LEE, 2010). De acordo com a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), um biossensor eletroquímico pode ser definido como um sistema integrado independentemente usando um biorreceptor em contato com uma parte de transdução eletroquímica que proporciona dados analíticos quantitativos ou semiquantitativos específicos (THÉVENOT et al., 1999).

Os biossensores podem ser classificados pelo tipo de transdutor, sendo que as principais categorias são: óptico, mecânico e eletroquímico. Dos quais os biossensores eletroquímicos são dispositivos analíticos que consistem, basicamente, de uma estrutura de duas partes na qual um componente biologicamente ativo, denominado bioreceptor, encontra-se diretamente ligado a um transdutor que permite obter uma resposta mensurável por meio de um sinal analítico gerado na reação com o analito (RIU; GIUSSANI, 2020). Especificamente, um sinal eletroquímico que pode ser medido, por exemplo, pelas técnicas de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE) e Voltametria Cíclica (VC). A Figura 1 exemplifica as principais partes de um biossensor eletroquímico, podendo gerar um sinal impedimétrico.

Figura 1 - Diagrama esquemático geral mostrando os principais componentes de um biossensor eletroquímico típico.



Forte: Elaborado pelo autor. (Fora da escala real)

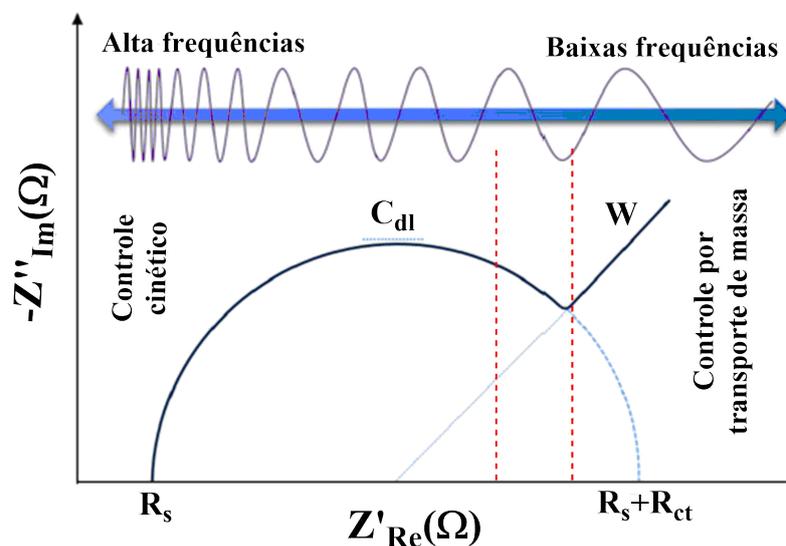
Dentro da classe dos biossensores eletroquímicos, eles podem ser subdivididos em: amperométricos, condutimétricos, potenciométricos e impedimétricos. Onde a detecção da interação entre o receptor e o alvo vai depender de medições de corrente, voltagem, impedância ou capacitância (KOTSIRI; VIDIC; VANTARAKIS, 2022). O princípio básico de um biossensor eletroquímico é medir as mudanças que ocorrem na proximidade da superfície do eletrodo, onde os elétrons fluem entre a superfície do eletrodo e o eletrólito em solução. Essas variações na superfície do eletrodo são medidas através de parâmetros como resistência do eletrólito, transferência de carga na interface ou transferência de massa da solução para a superfície do eletrodo (LEVA-BUENO; PEYMAN; MILLNER, 2020; RANDVIIR; BANKS, 2013).

No caso de biossensores impedimétricos, a impedância representa uma parte resistiva e uma capacitiva como efeito de uma interação complexa com um sinal de tensão de pequena amplitude em função da frequência. Esse tipo de biossensor é o interesse principal da presente pesquisa por não necessitar de nenhuma enzima específica para a detecção do analito, como é no caso dos biossensores amperométricos e potenciométricos. Ao invés disso, os biossensores impedimétricos dependem de um biorreceptor único que se liga especificamente ao analito, como anticorpos, aptâmeros (peptídeos que se ligam à moléculas-alvo específicas), DNA e várias proteínas (LEVA-BUENO; PEYMAN; MILLNER, 2020). A espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) é uma técnica de fácil operação, sensível e

direta que vem atraindo um grande interesse na comunidade científica para a detecção de *E. coli* O157:H7 (RAZMI et al., 2020). A impedância é apresentada como um número complexo (Z) com componentes real e imaginária que são as partes resistiva (Z') e capacitiva ($-Z''$), respectivamente. A oposição ao fluxo de corrente na superfície do eletrodo gera a parte resistiva, e o armazenamento de carga do sistema ao ser aplicada uma tensão resulta na parte capacitiva. Na interface eletrodo-solução, encontra-se dois modos pelos quais a eletricidade pode fluir através do eletrodo: (i) reação redox, processo Faradáico, e (ii) sistema capacitivo, processo não Faradáico (BARD; FAULKNER, 2001; RANDVIIR; BANKS, 2013; KOKKINOS; ECONOMOU; PRODROMIDIS, 2016).

Uma das formas de se medir a impedância de uma superfície modificada é através da imersão desta em uma solução eletrolítica contendo espécies redox. Os pares redox mais usuais para esses sistemas são $[\text{Fe}(\text{CN}_6)]^{3-/4-}$ (ferricianeto/ferrocianeto), $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$ hexamin rutênio (II/III) e ferroceno (Fc^+/Fc) (RUSHWORTH et al., 2013). Os dados de impedância são frequentemente exibidos na forma de diagramas de Nyquist, onde se tem uma relação entre as componentes real e imaginária da impedância para uma determinada faixa de frequência. A Figura 2 apresenta um gráfico de Nyquist ilustrativo onde a parte imaginária da impedância ($-Z''$), que está fora de fase, é plotada versus a componente real (Z'), que está em fase em cada frequência de excitação (GUAN; MIAO; ZHANG, 2004).

Figura 2 – Representação geral de um gráfico de Nyquist mostrando o semicírculo e as regiões controladas por cinética e transferência de massa. R_s : resistência da solução; R_{ct} : resistência à transferência de carga; C_{dl} : capacitância máxima da dupla camada; W : impedância de Warburg.

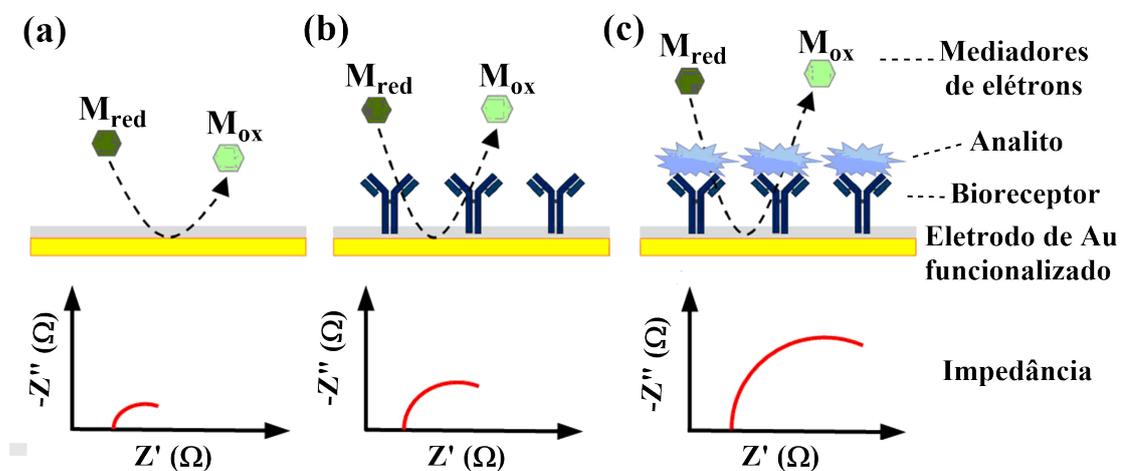


Fonte: Adaptada da referência (LEVA-BUENO; PEYMAN; MILLNER, 2020).

O diagrama de Nyquist apresenta formas diferentes em altas e baixas frequências. Em altas frequências, o sinal é controlado por processos cinéticos onde ocorre a transferência de carga dos mediadores redox na interface eletrodo-solução e a única limitação acontece pela resistência da solução (R_s). Em frequências medianas, existe pouca resistência no sistema e, conseqüentemente, as mudanças geradas são provenientes da capacitância, particularmente da capacitância da dupla camada elétrica (C_{dl}) na interface. Já em baixas frequências, a resposta é controlada por transferência de massa. Essa resistência é calculada por meio da resistência de transferência de carga (R_{ct}) obtida pela extrapolação do eixo de impedância real (Z'). Além disso, em alguns casos, pode ser observada uma distribuição linear dos pontos experimentais no final do arco de Nyquist que é atribuída à impedância de Warburg (W) (BARD; FAULKNER, 2001; LEVA-BUENO; PEYMAN; MILLNER, 2020; LVOVICH, 2012; MALHOTRA; ALI, 2018).

Usualmente, o aumento do valor da impedância tende a acontecer à medida que a superfície do eletrodo é modificada, já que quanto mais complexa a funcionalização da superfície mais resistência será observada, devido a maior dificuldade para os elétrons alcançarem a superfície do eletrodo, como mostrado na Figura 3.

Figura 3 - Esquema genérico de impedância para cada etapa de construção de um biossensor. (a) eletrodo de ouro (Au) funcionalizado, (b) biorreceptores são imobilizados na superfície e (c) ocorre a imobilização de um analito de interesse.

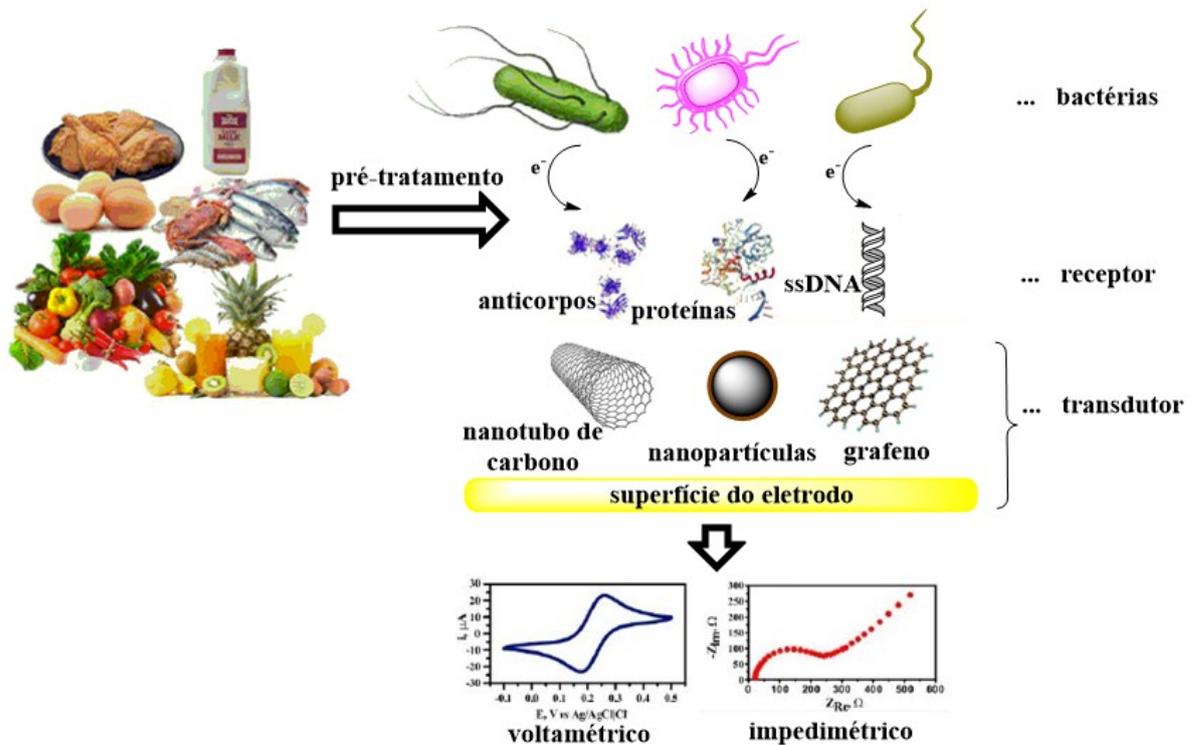


Fonte: Adaptada da referência (LEVA-BUENO; PEYMAN; MILLNER, 2020).

A ilustração acima mostra que a impedância aumenta à medida que novas espécies são depositadas sobre o eletrodo. A deposição de um material na superfície do biossensor, geralmente, aumenta a resistência e a capacitância dificultando a transferência de elétrons entre os mediadores redox em solução e a superfície do eletrodo. Em alguns casos, porém, pode acontecer a diminuição da impedância após a ligação de um analito ou molécula, uma vez que essa ligação pode distorcer a camada adsorvida do eletrodo e facilitar a aproximação dos mediadores redox, ou até mesmo facilitar essa transferência de carga devido à presença de algum material condutor (RUSHWORTH et al., 2014; LEVA-BUENO; PEYMAN; MILLNER, 2020).

Uma grande variedade de anticorpos e moléculas podem ser adsorvidas na superfície do eletrodo para serem utilizadas na camada de detecção como bioreceptores, desempenhando uma função importante na seletividade e sensibilidade do dispositivo (MAJDINASAB; HAYAT; MARTY, 2018). Além disso, vários materiais nanoestruturados podem ser usados na camada do transdutor como, por exemplo: grafeno, nanotubos de carbono, nanocompósitos poliméricos, nanopartículas magnéticas e nanopartículas de metais nobres (CHU; PENG; JIN, 2017). Para a detecção de bactérias patogênicas como a *E. coli*, nanopartículas e nanoestruturas de ouro têm ganhado considerável atenção. Esses nanomateriais oferecem uma ampla gama de possibilidades de modificação do eletrodo que podem aumentar o desempenho do biossensor melhorando parâmetros analíticos como estabilidade, sensibilidade ou limite de detecção (LOD) (RIU; GIUSSANI, 2020). A Figura 4 apresenta uma ilustração geral dos componentes de um biossensor eletroquímico para detecção de bactérias oriundas de alimentos, mostrando diferentes receptores e modificadores do transdutor (como uma superfície de ouro ou outros metais nobres, por exemplo) para obtenção de respostas voltamétricas e impedimétricas.

Figura 4 – Ilustração dos componentes de um biossensor eletroquímico para detecção de bactérias oriundas de alimentos.



Fonte: Adaptada da referência (RIU; GIUSSANI, 2020). (Fora da escala real)

O LOD é a quantidade mínima do analito que pode ser detectada por um biossensor. Para aplicações clínicas, é fundamental detectar o analito em amostras de baixas concentrações (ng/mL ou fg/mL) (CASTILLO-HENRÍQUEZ et al., 2020). Os limites permitidos de microrganismos presentes na água e alimentos se distinguem de acordo com o efeito do organismo na saúde humana e tipo de matriz. Por exemplo, é exigido a ausência de *Salmonella* nos alimentos. Já para água do mar ser considerada recreativa, é permitido a presença de 500 UFC (Unidade Formadora de Colônia) de *E. coli* e 200 UFC de enterococos em 100 mL de água (KOTSIRI; VIDIC; VANTARAKIS, 2022). Para a água ser considerada potável ou própria para consumo, a regulamentação estabelece que não deve haver presença de *E. coli* em 100 mL de amostra (CARRILLO; DURÁN, 2019), logo é importante o desenvolvimento de métodos com baixos limites de detecção para garantir a proteção da saúde pública (CARRILLO-GÓMEZ; DURÁN-ACEVEDO; GARCÍA-RICO, 2019; ODONKOR; AMPOFO, 2013).

O interesse pelo desenvolvimento de biossensores para detecção de bactérias transmitidas por alimentos vem crescendo, pois reflete a contaminação das águas. De acordo com Cui e Liang, a contaminação de águas residuais tem um grande impacto no aumento de patógenos transmitidos por alimentos (CUI; LIANG, 2019). Contudo, ainda encontram-se limitações para as aplicações reais desses biossensores em águas residuais. Isso acontece porque as águas residuais proporcionam condições ideais para o crescimento de patógenos, dificultando a interpretação dos sinais na presença de muitas bactérias desconhecidas. Além disso, os alvos estão presentes em concentrações muito baixas nessas águas (MAO et al., 2021).

Dentro desse contexto, as monocamadas automantadas (SAMs, do inglês *Self-Assembled Monolayers*) vêm sendo, amplamente, empregadas na elaboração de biossensores por oferecer um sistema onde se pode controlar as propriedades interfaciais (POIRIER AND PYLANT, 1996). As SAMs de compostos organossulfurados (tióis, dissulfetos, sulfetos) são formadas em substratos metálicos, particularmente de metais nobres como o ouro, prata, cobre e paládio, por exemplo. A formação da SAM ocorre por meio de adsorção espontânea devido à afinidade química dos átomos de enxofre por átomos de ouro, prata e cobre (LOVE et al., 2005).

O ouro (Au) é um bom candidato como substrato na formação de SAMs devido a vantagens tais como: disponibilidade comercial, inércia em relação à oxidação e biocompatibilidade (LOVE et al., 2005; KOSSOY et al., 2015). A cisteína é um composto amplamente empregado na elaboração de SAMs pois forma uma ligação estável com o ouro pelo átomo de enxofre, já que a ligação do grupo tiol à superfície do ouro é muito forte (ULMAN, 1996), deixando os dois grupos terminais (-COOH e -NH₂) livres permitindo, ainda, modificações subsequentes (QINGWEN et al., 2001).

Após a imobilização de bioreceptores ou materias transdutores na superfície do eletrodo, é importante que o agente de reconhecimento não perca a sua capacidade de interagir com o analito de interesse. Os métodos mais relevantes para essa imobilização envolvem a formação de ligações iminas com glutaraldeído e a formação de ligações amidas com a adição do par de ativadores N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida hidrocloreto (EDC) e N-hidroxisulfosuccinimida (NHS). A geração de ligação amida usando esse par de ativadores apresenta vantagens quando comparada a métodos que utilizam apenas o glutaraldeído. Dentre essas, pode-se citar: alta eficiência de conversão, biocompatibilidade

com pouca interferência na bioatividade das moléculas alvo, produtos mais limpos e reações em condições mais brandas de temperatura e pH (LOPEZ-TELLEZ et al., 2020).

Os nanomateriais estão surgindo como materiais promissores no desenvolvimento de biossensores devido, em parte, às suas dimensões nanométricas que são compatíveis com materiais biológicos, abrangendo proteínas, anticorpos, enzimas e nucleotídeos. Essa relação dimensional possibilita o uso em aplicações médicas e viabiliza a detecção de baixas concentrações do analito de interesse devido à elevada área superficial desses materiais, atividade eletroquímica e condutividade elétrica, podendo ser usados para amplificar os sinais de detecção (SIMÃO et al., 2020; KADADOU et al., 2022). Em função dessas vantagens, nos últimos anos as nanopartículas magnéticas (MNPs) têm recebido considerável atenção pelos pesquisadores devido à variada gama de aplicações em biotecnologia e biomedicina (LU; SALABAS; SCHÜTH, 2007).

As nanopartículas de ferrita de cobalto (CoFe_2O_4) foram utilizadas nesse trabalho devido às suas vantagens em relação às nanopartículas de óxido de ferro (Fe_3O_4) que já são comumente empregadas em diversas aplicações biológicas. As ferritas apresentam forte anisotropia, alta coercividade, moderada magnetização de saturação e boa estabilidade química e térmica (KAZEMI; GHOBADI; MIRZAIE, 2018). Esse tipo de material pode ser sintetizado por diferentes métodos, como co-precipitação, hidrotérmico, método do poliálcool, microemulsão, entre outros, gerando NPs com diferentes tamanhos e formas (LU et al., 2015). Embora o método de decomposição térmica ou poliálcool apresente a vantagem de produzir partículas muito monodispersas, possui a desvantagem de que as nanopartículas geradas são solúveis apenas em solventes não-polares. Dessa forma, para tornar as NPs apropriadas para aplicações biológicas, o revestimento de surfactantes hidrofóbicos, que são utilizados durante a síntese das NPs, precisa ser substituído por um revestimento hidrofílico, biocompatível e funcional que permita a interação controlada com espécies biológicas (DE PALMA et al., 2007).

Além disso, após a síntese das NPs, é importante manter a estabilidade das mesmas sem aglomeração ou precipitação por um longo período. Essas NPs são sensíveis à oxidação, podendo formar finas camadas de óxido sobre a superfície que modificam as propriedades devendo-se, assim, ter cuidado com a estabilidade dessas partículas como requisito para suas aplicações (LU; SALABAS; SCHÜTH, 2007). Por esse motivo, foi utilizado uma estratégia que já é bastante empregada para proteção das NPs, através do

revestimento com sílica (APTES), que protege o núcleo magnético apresentando diversas vantagens, como por exemplo: estabilidade química e térmica em meio aquoso mantendo o equilíbrio entre as forças atrativas e repulsivas, alta força de ligação com núcleos de ferro, ótima resistência a solventes orgânicos, além de permitir a modificação da superfície com grupos funcionais $-\text{NH}_2$. Adicionalmente, como o método de síntese por decomposição térmica via poliol resulta em partículas hidrofóbicas, o revestimento com o silano altera as propriedades da superfície das NPs que são hidrofóbicas para hidrofílicas (GAWANDE et al., 2015; LIEN; WU, 2008). Os silanos são amplamente reportados na literatura para recobrimento de NPs devido ao revestimento eficiente na superfície por meio de ligações covalentes que podem resultar em camadas compactas e em uma grande variedade de grupos terminais funcionais ($-\text{NH}_2$, $-\text{SH}$, $-\text{COOH}$, $-\text{PEG}$, etc) (DE PALMA et al., 2007).

Esse tipo de nanomaterial vem sendo largamente empregado em biossensores eletroquímicos visto que são passíveis de funcionalização que, por sua vez, pode aumentar a afinidade bioreceptor-analito (RAVALLI; MARRAZZA, 2015). Além disso, o uso desses materiais na superfície do eletrodo pode aumentar o número de biomoléculas que serão imobilizadas como receptores e fornecer uma condutividade elétrica mais forte (KAYA et al., 2021). É importante citar que a imobilização de moléculas de bioreceptores diretamente sobre o eletrodo pode bloquear a superfície afetando, negativamente, os processos de transferência de carga que resultam nos sinais analíticos. Apesar de as vantagens apresentadas por biossensores que contêm nanomateriais sobre os biossensores convencionais, ainda existem alguns desafios relacionados à miniaturização que devem ser considerados (KADADOU et al., 2022).

Atualmente, vários trabalhos vêm sendo reportados sobre a utilização de MNPs na elaboração de plataformas sensoras para diferentes finalidades, tais como detecção de bactérias patogênicas, vírus e células cancerosas (RIU; GIUSSANI, 2020; MOKHTARZADEH et al., 2017; DUTTA et al., 2018). Dutta e colaboradores (DUTTA et al., 2018) modificaram eletrodos de platina com nanocompósitos de grafeno e NPs de Fe_3O_4 conjugados com lectina para detecção de células cancerosas e liberação controlada de drogas. Outros trabalhos reportam o uso de MNPs em biossensores impedimétricos para detecção de bactérias patogênicas de origem alimentar, citando-se NPs de Fe para detecção de *E. coli* em amostras de carne e NPs de Fe_3O_4 para detecção de *Campylobacter jejuni* (WANG; YE; YING, 2012). Em outro estudo, Lingxian e colaboradores funcionalizaram MNPs de Fe_3O_4

com sílica e anticorpos para determinação de *E. coli* O157:H7, alcançando um baixo limite de detecção ($1,83 \times 10^2$ UFC/mL) (YE; ZHAO; DOU, 2018). Um biossensor impedimétrico para detecção de *E. coli* que é bastante relevante foi reportado por Varshney e colaboradores que utilizaram microeletrodos modificados e inseridos em um dispositivo microfluídico para detecção de *E. coli* O157:H7 (VARSHNEY et al., 2007). Com esse dispositivo, foi possível detectar baixas concentrações de bactérias ($1,2 \times 10^3$ UFC/mL) em amostras de carne moída em 35 minutos. Nesse trabalho, os autores empregaram anticorpos específicos para *E. coli* que foram conjugados com MNPs via acoplamento biotina-estreptavidina (MICHAEL GREEN, 1990). Os conjugados formados capturam as bactérias da amostra e as concentraram após a aplicação de um campo magnético externo. As células foram separadas em um volume desejado e adequado para a medição de impedância, onde a amostra foi inserida em um dispositivo microfluídico para análise eletroquímica (VARSHNEY et al., 2007). Outro trabalho que utiliza essa propriedade de magnetização das NPs foi reportado por Wang e colaboradores que aplicaram nanoesferas magnéticas de Fe_3O_4 revestidas com anticorpos para separar e transportar *E. coli* O157:H7 de um meio de cultura para outra plataforma onde foi feita a medição eletroquímica e, também, para concentrar e precipitar as bactérias no eletrodo (WANG et al., 2015). São relatados, também, trabalhos que utilizam esferas magnéticas revestidas com anticorpos para separar e concentrar bactérias de matrizes de amostra após o processo de enriquecimento ou pré-concentração. Papadakis e colaboradores utilizaram esferas imunomagnéticas em um biossensor para capturar *Salmonella Typhimurium* no leite (PAPADAKIS et al., 2018; XU; BAI; BHUNIA, 2021).

Vem sendo comum essas estratégias de pré-concentração magnética do patógeno antes da análise para aumentar a sensibilidade de detecção usando, por exemplo, esferas magnéticas funcionalizadas com aptâmeros que se ligam especificamente ao alvo (KOTSIRI et al., 2019). Essa pré-concentração da bactéria antes da análise proporciona a separação do analito no alimento eliminando, assim, moléculas da matriz que podem interferir na detecção (KOTSIRI; VIDIC; VANTARAKIS, 2022). Portanto, o processo de separação das espécies alvo de uma amostra por magnetismo usando esferas magnéticas vem se tornando uma abordagem de preparação de amostra muito comum utilizada em aplicações de detecção de diferentes patógenos. A pré-concentração do alvo através de processos de separação utilizando esferas magnéticas geralmente abrange a ligação dessas partículas magnéticas funcionalizadas com anticorpos às espécies de interesse. E os nanocompósitos formados (MNPs-alvo) são

posteriormente separados da solução pela aplicação de campos magnéticos externos (CHEN et al., 2017).

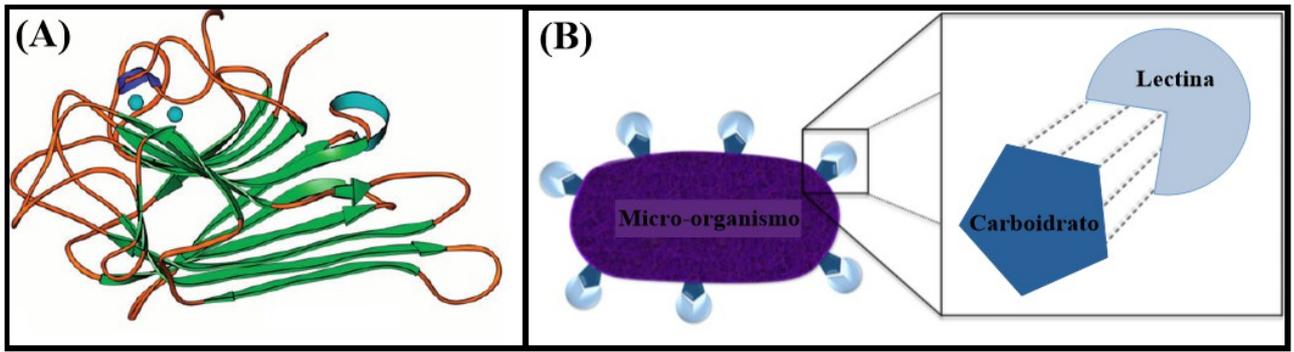
Apesar do avanço atual da nanotecnologia, é necessário aprofundar os estudos sobre a toxicidade e a estabilidade dos nanomateriais em ambientes aquosos e sobre o desenvolvimento de novos materiais com baixo custo. Mesmo a eletroquímica sendo uma técnica promissora e sensível que vem ganhando destaque na detecção de patógenos, o fato das bactérias inteiras apresentarem um tamanho relativamente grande em comparação com alvos biológicos típicos e a existência de diferentes locais antigênicos (ou determinante antigênicos: são as diversas estruturas do antígeno que podem ser reconhecidas pelo anticorpo) na superfície das bactérias costumam levar a abordagens não específicas gerando um desafio adicional para a comunidade científica (RAZMI et al., 2020). O desempenho dos biossensores pode ser influenciado por uma diversidade de parâmetros, tais como o tipo do transdutor, a afinidade dos bioreceptores com o analito e a matriz da amostra (KOTSIRI; VIDIC; VANTARAKIS, 2022).

Existem cerca de 68 tipos de elementos de reconhecimento que podem ser imobilizados no eletrodo para a detecção de patógenos (TEMPLIER et al., 2016). Essa imobilização tem como objetivo obter uma ligação irreversível e estável entre o elemento de bioreconhecimento e o eletrodo, concedendo uma densidade de empacotamento e orientação adequadas que permitam um fácil acesso e afinidade de ligação às espécies de interesse. Dentre os bioreceptores, as lectinas têm mostrado potencial para o desenvolvimento de novas plataformas nanoestruturadas para detecção de bactérias, glicoproteínas ou células inteiras. As lectinas são proteínas de interesse para o desenvolvimento de biossensores em função das suas propriedades específicas de interação com resíduos de carboidratos, livres ou conjugados, podendo se ligar de forma não covalente e reversível com açúcares e, dessa forma, serem utilizadas como bioreceptores (MI et al., 2021; SIMÃO et al., 2020). Estudos relatam que as lectinas se ligam especificamente a constituintes de carboidratos presentes na superfície de bactérias e vírus (KEARNS et al., 2017).

A proteína *Concanavalina A* (ConA) é um tipo de lectina oriunda de leguminosas extraída da *Jack Bean* (*Canavalian ensiformis*) que se liga a carboidratos, sendo específica para os monossacarídeos D-glicose e D-manose que estão presentes na superfície das paredes celulares de bactérias Gram-negativas (SHEN et al., 2007). Algumas lectinas apresentam íons metálicos na sua estrutura que são necessários para a sua atividade biológica, como no caso da

ConA, onde cada subunidade da proteína contém um íon Mn^{2+} e um Ca^{2+} . A presença desses íons é fundamental para a ligação entre a proteína ConA e a molécula de açúcar. As interações entre carboidratos e lectinas envolvem forças atrativas, incluindo ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e eletrostáticas, sendo as primeiras as mais importantes no reconhecimento carboidrato-lectina, como apresentado na Figura 5.

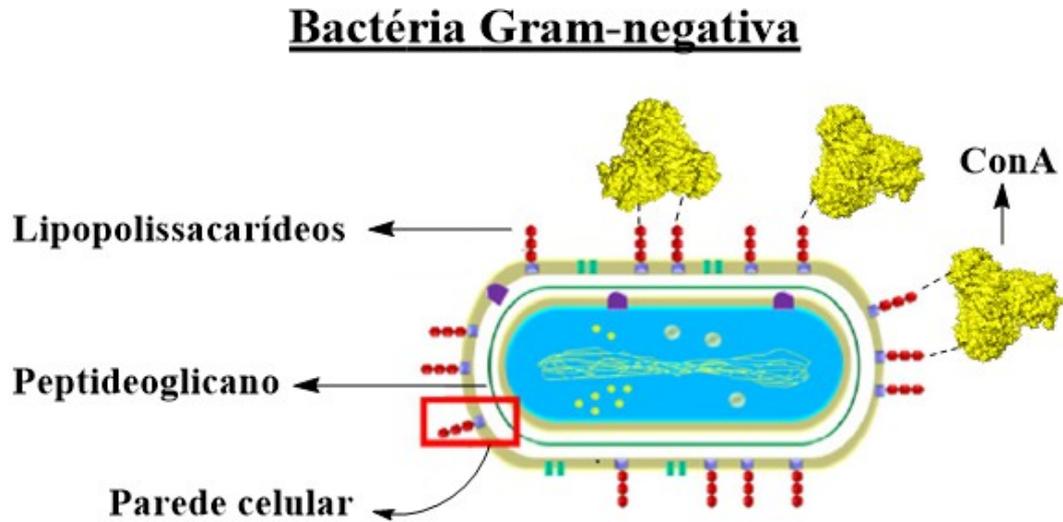
Figura 5 - (A) Estrutura tridimensional do monômero da *Concanavalina A* e (B) atração entre lectinas e os carboidratos presentes na superfície microbiana. As linhas tracejadas mostram as forças atrativas de ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e eletrostáticas.



Fonte: Adaptada das referências (HEYMANN et al., 2015; BREITENBACH BARROSO COELHO et al., 2018).

Os lipopolissacarídeos (LPS) são moléculas grandes que constituem parte da parede celular de bactérias Gram-negativas, como a *Salmonella typhimurium* e *E. coli*, e contribuem na estabilização da parede celular bacteriana (CAROFF; KARIBIAN, 2003). Essas moléculas consistem de um lípido e um polissacarídeo (carboidrato) ligados através de ligação covalente, apresentando assim resíduos de D-glicose terminal que podem, eventualmente, interagir com a lectina ConA (MI et al., 2021; SHAANAN; LIS; SHARON, 1991), como representado na Figura 6. Existe uma forte ligação de hidrogênio entre os grupos de oligossacarídeos do LPS e os resíduos de aminoácido polar das lectinas.

Figura 6 - Modelo esquemático da interação de lectinas *Concanavalina A* com LPS da superfície celular de bactérias Gram-negativas.



Fonte: Adaptada da referência (BREITENBACH BARROSO COELHO et al., 2018).

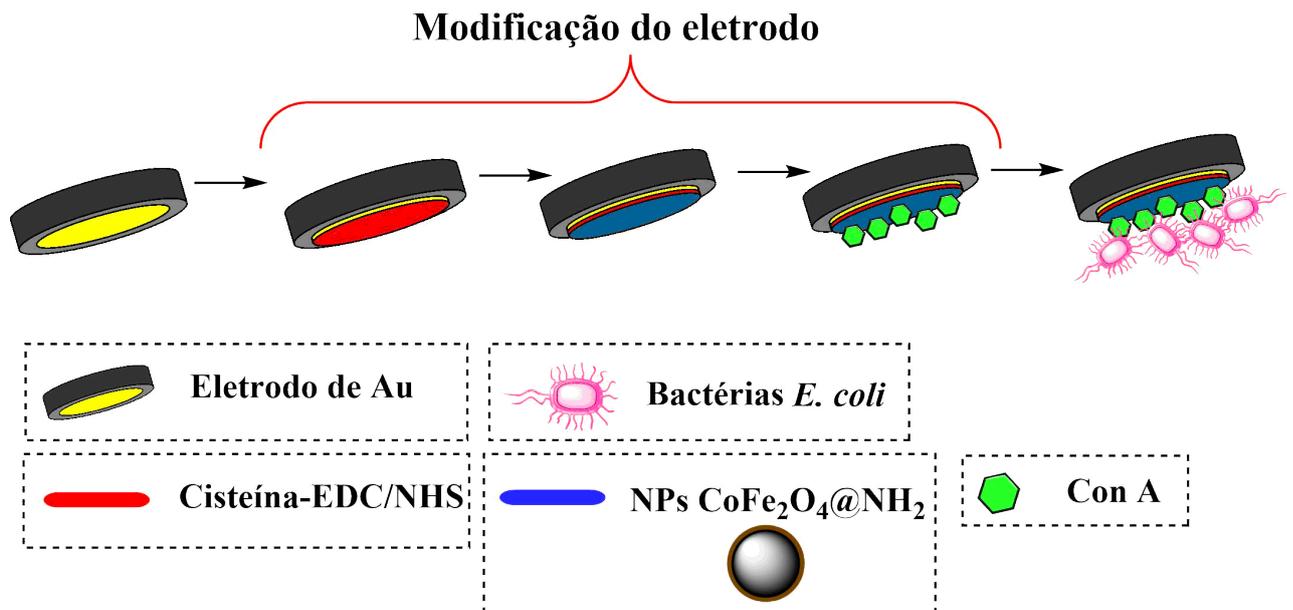
Vários biossensores para bactérias foram projetados com base nas interações entre lectinas e glicoconjugados nas superfícies das células bacterianas. As lectinas são candidatas especialmente interessantes para uso como elementos de reconhecimento devido à sua facilidade de produção e estabilidade inerente (YANG et al., 2016). Devido a essas características, vem crescendo as perspectivas de aplicação usando as lectinas na área de detecção de patógenos transmitidos por alimentos e água.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho tem como justificativa a necessidade de desenvolver plataformas sensoras de baixo custo para detecção de bactérias patogênicas, tal como *E. coli*, com prospecção de análises de amostras provindas de alimentos e águas contaminadas passíveis de serem empregadas em pontos de atendimento em regiões de baixo poder aquisitivo. Nesse contexto, o objetivo geral deste projeto de mestrado foi construir uma nova plataforma sensora em que o transdutor foi um eletrodo de ouro modificado, inicialmente, com cisteína e o par de ativadores hidrocloreto de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC) e N-hidroxisulfosuccinimida (NHS). Sobre a camada de cisteína, foram imobilizadas NPs de ferrita de cobalto (CoFe_2O_4) funcionalizadas com a molécula 3-aminopropiltriétoxissilano (APTES) que contém grupos amino. O bioreceptor usado foi a lectina ConA devido à afinidade por D-glicose e D-manose presentes na superfície de bactérias gram-negativas, tal como a bactéria *E. Coli* usada neste estudo. A Figura 7 apresenta um esquema geral das etapas de modificação do eletrodo para construção da plataforma proposta nesse trabalho.

Figura 7 – Esquema geral das etapas de modificação do eletrodo para detecção de *E. coli*.



Fonte: Elaborado pelo autor. (Fora da escala real)

2.2 Objetivos específicos

- Sintetizar nanopartículas magnéticas de CoFe_2O_4 pelo método do poliol modificado a fim de obter um material em escala nanométrica e tamanho uniforme;
- Revestir a superfície das nanopartículas sintetizadas com 3-aminopropiltrietoxissilano (APTES) para formação das NPs funcionalizadas com grupos amino;
- Caracterizar as partículas sintetizadas por técnicas de difração de raios X, microscopia eletrônica de transmissão (MET), espalhamento dinâmico de luz (DLS) e espectroscopia vibracional na região do infravermelho (IV);
- Modificar eletrodos de Au com cisteína e NPs de $\text{CoFe}_2\text{O}_4@NH_2$ para imobilização da lectina ConA e detecção das bactérias *E. coli*;
- Caracterizar cada etapa de formação da plataforma sensora pelas técnicas de voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE);
- Imobilizar as bactérias *E. coli* sobre o biossensor em diferentes concentrações a fim de obter uma curva de calibração;
- Determinar o limite de detecção e quantificação do biossensor formado a partir da curva de calibração obtida através dos diagramas de Nyquist.

3 METODOLOGIA

3.1 Reagentes

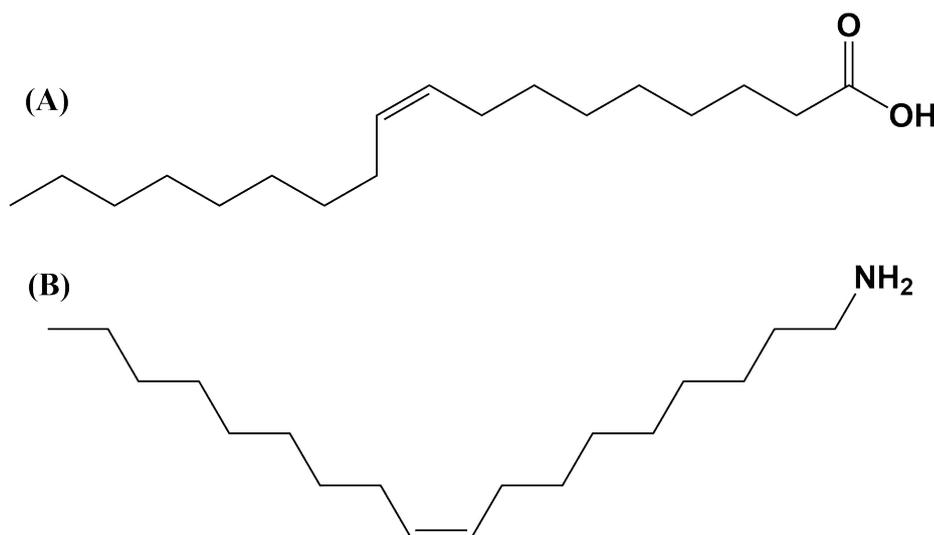
Os reagentes químicos utilizados nos experimentos foram obtidos de fonte comercial e sem tratamento preliminar. As soluções aquosas foram preparadas usando água deionizada (Milli-Q®, Millipore Inc.) com resistência de 18 MΩcm a 25 °C. Acetilacetonato de ferro (III) ($[\text{Fe}(\text{acac})_3]$, 99,9%, Sigma-Aldrich), acetilacetonato de cobalto (II) ($[\text{Co}(\text{acac})_2]$, 99%, Sigma-Aldrich), 1,2-dodecanodiol (90%, Sigma-Aldrich), ácido oleico (90%, Sigma-Aldrich), oleilamina (70%, Sigma-Aldrich), dibenzil éter (98%, Fluka Analytical), etanol absoluto (99,5%, Synth), N-Hexano (98,5%, Synth), 3-aminopropiltriétoxisilano (APTES, 99%, Sigma-Aldrich), ácido acético (99,7%, Tedia), hidróxido de potássio (KOH, 99,9%, Sigma-Aldrich), ácido sulfúrico (H_2SO_4 , 99,9%, Merck), cloreto de potássio (KCl, 99%, Sigma-Aldrich), hexacianoferrato(II) de potássio ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, 98,5%, Acros Organics), hexacianoferrato(III) de potássio ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, 99+%, Acros Organics), L-cisteína (98%, Sigma-Aldrich), N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida hidrocloreto (EDC, 99%, Sigma-Aldrich), N-hidroxisulfosuccinimida (NHS, 98%, Sigma-Aldrich), fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4 , 99%, Sigma-Aldrich), fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4 , 98%, Sigma-Aldrich), cloreto de sódio (NaCl, 99%, Sigma-Aldrich), Concanavalin A de *Canavalia ensiformis* (Jack bean) de procedência Sigma-Aldrich. As soluções contendo as bactérias *E. coli* BL21(DE3) foram preparadas no laboratório de Bioinorgânica da Universidade Federal do Ceará (UFC) onde, após a sua inoculação e crescimento, foram armazenadas a 4 °C em solução tampão de fosfato (PBS) 10 mmol L⁻¹, pH=7,4 (contendo 137 mmol L⁻¹ de NaCl, 2,7 mmol L⁻¹ de KCl, 10 mmol L⁻¹ de Na_2HPO_4 e 1,8 mmol L⁻¹ de K_2HPO_4). A determinação da contagem das colônias de bactérias para calcular a concentração das mesmas em UFC/mL foi feita através do método de contagem em placa de ágar (BREED; DOTERRER, 1916; JETT et al., 1997; SUTTON SCOTT, 2011).

3.2 Síntese das nanopartículas de CoFe_2O_4

As nanopartículas magnéticas de CoFe_2O_4 foram sintetizadas pelo método do poliol modificado (SILVA, 2014), baseado na redução dos precursores metálicos $[\text{Fe}(\text{acac})_3]$ e $[\text{Co}(\text{acac})_2]$, e utilizando o 1,2-dodecanodiol, este como agente redutor. Essa metodologia fornece um excelente controle da morfologia, tamanho e na monodispersividade das

partículas. As nanopartículas resultantes desse procedimento são estáveis em solventes apolares (como o hexano) e cobertas com grupos terminais apolares em sua superfície. Os ligantes de capeamento usados são frequentemente alcanos de cadeia longa com grupos polares que se ligam à superfície das nanopartículas. O ácido oleico, por exemplo, é largamente utilizado na síntese de nanopartículas de ferrita porque pode formar uma monocamada protetora densa, produzindo partículas altamente uniformes e monodispersas (CAROFF; KARIBIAN, 2003). Os surfactantes ácido oleico (AO) e oleilamina (OL) foram empregados para estabilização das NPs em solventes orgânicos, atuando como agentes de superfície, além de gerar partículas monodispersas. A Figura 8 mostra as estruturas dos dois surfactantes utilizados.

Figura 8 – Estruturas do ácido oleico (A) e da oleilamina (B) utilizados na síntese das NPs.



Fonte: Elaborado pelo autor.

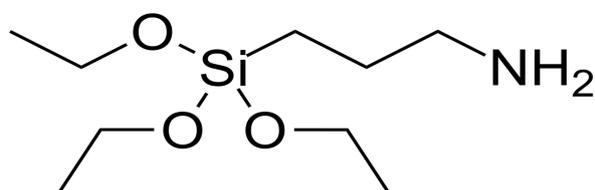
De forma mais detalhada, as NPs foram preparadas como segue: em um balão de três bocas com fundo redondo contendo dibenzil éter (20 mL), foram adicionados os precursores $[\text{Fe}(\text{acac})_3]$ (1,0 mmol) e $[\text{Co}(\text{acac})_2]$ (2,0 mmol), além do redutor 1,2-dodecanodiol (10 mmol). A mistura reacional foi desaerada com gás argônio (Ar) por 30 min a temperatura ambiente e sob agitação magnética. Inicialmente, o sistema foi aquecido até 100 °C e mantido nesta temperatura por 20 min. Nesse intervalo, foram adicionados os surfactantes AO (6,0 mmol) e OL (6,0 mmol). Após esse tempo, a temperatura do sistema foi aumentada para 200 °C e mantida durante 2 h para a decomposição e redução dos precursores metálicos. Em seguida, para a etapa de nucleação das partículas, a temperatura foi elevada

para 300 °C (próximo à temperatura de refluxo do solvente que é de 298 °C) e mantida por mais 1 h. Após esse período, a fonte de calor foi removida e o sistema resfriado para temperatura ambiente. As partículas foram lavadas três vezes por centrifugação (7500 rpm) com uma solução 20:80 (hexano:etanol), secas e armazenadas em dessecador. Para evitar a oxidação das partículas durante as etapas de lavagem, todos os solventes utilizados foram previamente desaerados sob fluxo de gás Ar por cerca de 30 min. As partículas também foram submetidas a um breve fluxo de gás Ar entre cada etapa de lavagem por centrifugação.

3.3 Revestimento das NPs de CoFe₂O₄ com APTES

Para proteger as nanopartículas e possibilitar a funcionalização das superfícies, foi realizado um revestimento com sílica através de uma reação de troca de ligante baseado na metodologia de De Palma e colaboradores (DE PALMA et al., 2007) com algumas modificações. A troca de ligantes é um método bem conhecido para ajustar as propriedades da superfície de nanopartículas. Envolve a adição de um excesso de ligante à dispersão de nanopartículas, o que resulta no deslocamento do ligante original presente na superfície das NPs. Para o revestimento, foi utilizado o composto 3-aminopropiltriethoxissilano (APTES) que proporciona a funcionalização das NPs com grupos NH₂. A Figura 9 mostra a estrutura do composto empregado nessa etapa.

Figura 9 – Estrutura do composto 3-aminopropiltriethoxissilano (APTES) usado para o revestimento das NPs.

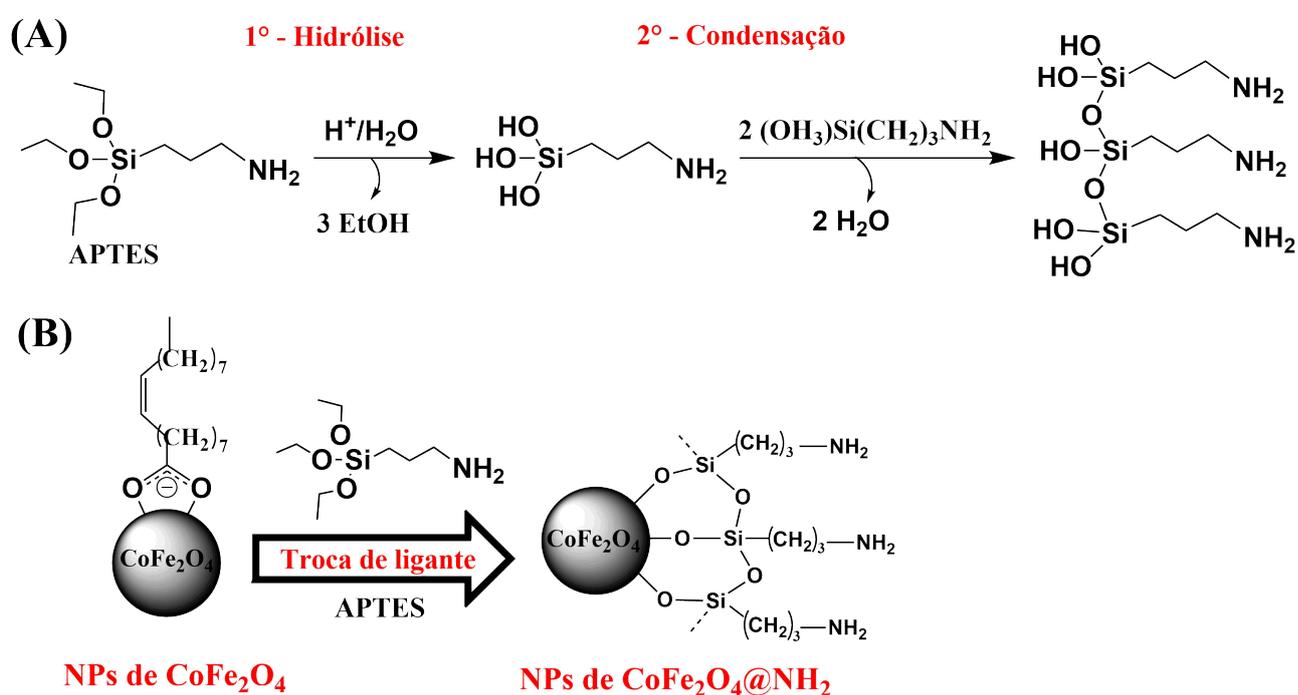


Fonte: Elaborado pelo autor.

A figura 10 mostra um esquema geral das reações químicas durante a funcionalização das nanopartículas de CoFe₂O₄ com alcoxissilanos. A reação de silanização ocorre em duas etapas: primeiramente, o organossilano é colocado em uma solução aquosa com um ácido que atua como catalisador. A formação da molécula de silanol ocorre por reação de hidrólise com a água, onde os grupos alcóxidos são substituídos por grupos

hidroxila para formar grupos silanóis reativos, que se condensam com outros grupos silanóis para produzir ligações Si—O—Si estáveis antes da formação de ligações Fe—O—Si na superfície das NPs. Álcool (EtOH) e água são produzidos como subprodutos da condensação. Por fim, essa policondensação produz uma rede de silanos na superfície da nanopartícula após a reação de troca de ligante (YAMAURA et al., 2004; WU; HE; JIANG, 2008).

Figura 10 - (A) Esquema das reações de hidrólise e condensação do APTES em meio ácido e (B) troca dos ligantes de ácido oleico na superfície da NPs de CoFe_2O_4 pelo silano APTES.



Fonte: Elaborado pelo autor.

O procedimento foi realizado da seguinte forma: em um banho ultrassom e sob atmosfera de argônio, 50 mL de uma dispersão contendo 6,0 mg das NPs de CoFe_2O_4 foram misturados com 50 μL de ácido acético concentrado. Após 5 min em sonicação, 1,0 mL de etanol contendo 15 μL de APTES foi gotejado sobre a dispersão das NPs. A mistura foi deixada em sonicação por 30 minutos e, por fim, mantida em incubadora sob agitação orbital por 72 h em temperatura ambiente. Após esse período, foi feita a lavagem das partículas por centrifugação (10000 rpm) com hexano para retirar resíduos de surfactantes do meio orgânico e, em seguida, com etanol (três vezes) para retirar excesso de APTES. Após o processo de lavagem, as partículas foram dispersas em água Milli-Q (~ 6 mL) e armazenadas a temperatura ambiente (~ 30 °C). Esse tipo de partícula modificada com silano que contém

grupamentos amino apresenta alta dispersibilidade e excelente estabilidade em água, como relatado por De Palma e colaboradores (DE PALMA et al., 2007).

3.4 Técnicas de caracterização das NPs

O difratograma de raios-X das NPs de CoFe_2O_4 sintetizadas foi obtido em um difratômetro da Panalytical XPert Pro MPD equipado com um tubo de cobalto com radiação $\text{CoK}\alpha$ ($\lambda = 1,7890$ nm), operando com uma tensão de 40 kV e corrente de 40 mA, em modo contínuo com tamanho do passo de $0,013^\circ$ na faixa angular de 10 a 100° (2θ) a 300 K. Para a execução da medida, a amostra sólida que foi previamente seca em dessecador a vácuo, foi macerada e compactada em um porta-amostras de silício. A análise foi realizada no Laboratório de Raios X (LRX) da UFC. A identificação das fases presentes na amostra foi realizada pelo programa X'Pert HighScore Plus. Já o refinamento de estrutura foi realizado segundo o método de Rietveld usando o software GSAS I – EXPGUI. Imagens da estrutura cristalina foram geradas utilizando-se o software VESTA, através da ficha cristalográfica da ferrita de cobalto obtida no banco de dados COD-*Crystallography Open Database* (código 1540973).

Os espectros vibracionais na região do infravermelho foram obtidos em pastilha de KBr, em uma janela espectral de 4000 a 400 cm^{-1} , utilizando um espectrômetro FTLA 2000-102 da ABB Bomem.

As análises de microscopia eletrônica de transmissão (MET) das NPs foram realizadas no CEDENNA na Universidade de Santiago de Chile, em um microscópio eletrônico HITACHI HT7700 operando em 120 keV. O tamanho médio das partículas e a distribuição de tamanhos foram calculados para as NPs a partir dos diâmetros de mais de 100 partículas escolhidas aleatoriamente em imagens de MET em resoluções diferentes (20, 50 e 100 nm), utilizando o software para análise de imagens ImageJ. As amostras foram preparadas, inicialmente, pela dispersão das NPs em hexano (para CoFe_2O_4) e água Milli-Q (para $\text{CoFe}_2\text{O}_4@(\text{NH}_2)$). As suspensões foram sonicadas em banho ultrassom por 15 min para garantir a completa dispersão e, em seguida, foi feito o gotejamento dessas suspensões sobre grades de cobre (300-mesh) cobertas com filmes de carbono, seguida pela secagem das amostras em dessecador a temperatura ambiente.

As medidas de espalhamento dinâmico de luz (DLS) foram obtidas em um analisador de partículas Zetasizer Nano ZS, modelo 3600, da Malvern Panalytical, no modo backscatter (ângulo de 173°) no Laboratório de Polímeros da UFC. As NPs de CoFe_2O_4 foram analisadas dispersas em hexano e as NPs de $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{NH}_2$ em uma dispersão aquosa (0,5 mg/mL para ambas). Cada medida foi feita em uma cubeta de material diferente (cubeta de vidro para hexano e cubeta de poliestireno para água) com o parâmetro de “dispersante” sendo alterado de acordo com o solvente empregado. As medidas foram feitas em triplicata a temperatura ambiente ($\sim 25^\circ\text{C}$) e cada amostra foi sonicada em banho ultrassom por 10 min antes das medidas.

3.5 Medidas eletroquímicas

As medidas eletroquímicas de voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) foram realizadas em um potenciostato AUTOLAB PGSTAT 302N. Para tanto, utilizou-se uma célula eletroquímica de vidro com entradas para os eletrodos de trabalho, auxiliar (fio de platina em forma de espiral) e de referência ($\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{Cl}^-$, KCl saturado). Eletrodos policristalinos de ouro de área geométrica (A_{geom}) de $0,0314\text{ cm}^2$ (BAS) foram utilizados como eletrodos de trabalho.

Os experimentos foram realizados sob atmosfera inerte de argônio (Ar) e a temperatura ambiente ($\sim 25^\circ\text{C}$). Todos os potenciais citados neste trabalho referem-se à interface $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{Cl}^-$.

3.5.1 Pré-tratamento da superfície de ouro

Eletrodos de ouro policristalinos necessitam, normalmente, de três etapas de limpeza antes de iniciar as modificações na superfície a fim de obter áreas normalizadas para a formação das monocamadas. A primeira etapa de limpeza consiste em um procedimento químico, onde o eletrodo foi imerso em uma solução “piranha” ($\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$, 3:1) por 3 minutos. Em seguida, o eletrodo foi lavado com água Milli-Q e submetido a polimento mecânico com movimento em forma de oito para evitar efeitos de borda. Nessa etapa, foi utilizado pasta de alumina ($0,05\mu\text{m}$ de granulação) para o polimento da superfície de Au (ELGRISHI et al., 2018). Após o polimento, o eletrodo foi sonicado por 2 min em água Milli-Q para retirar partículas de alumina.

A última etapa de limpeza consiste em um procedimento eletroquímico. Primeiramente, foram realizadas 20 varreduras cíclicas a 500 mV s^{-1} na faixa de potencial de $-0,4 \text{ V}$ a $-1,8 \text{ V}$ em solução $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de KOH . Após lavagem do eletrodo com água, foram realizadas varreduras cíclicas a 500 mV s^{-1} na faixa de potencial de $-0,4 \text{ V}$ a $+1,8 \text{ V}$ em solução $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de H_2SO_4 . O processo de limpeza foi finalizado após obtenção do perfil característico de um eletrodo de ouro policristalino limpo (HAMELIN, 1988).

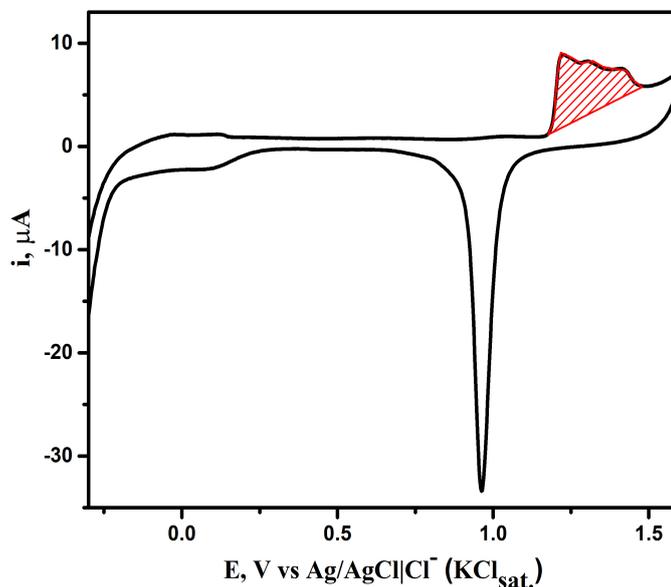
3.5.2 Determinação da área ativa do eletrodo de ouro

Após a metodologia de limpeza do eletrodo, foi realizado uma varredura cíclica a 100 mV s^{-1} em solução $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de H_2SO_4 varrendo-se o potencial de $-0,4 \text{ V}$ a $1,6 \text{ V}$. Nessa faixa de potencial, são observados os processos característicos da formação de óxidos de ouro (BRUCKENSTEIN; SHAY, 1985) como mostrado no voltamograma da Figura 11.

A área eletroquimicamente ativa do eletrodo de ouro (A_{ativa}) e o fator de rugosidade ($f_r = A_{\text{ativa}}/A_{\text{geom}}$) foram determinados a partir da carga referente ao processo de formação dos óxidos de ouro mostrado na região hachurada da curva voltamétrica ilustrada na Figura 11. Para metais que exibem processos de dessorção e adsorção de óxidos bem definidos, é possível aplicar esse método para calcular a área ativa do eletrodo. A carga do processo é obtida pela razão da área da onda pela velocidade de varredura. Sabendo que para ouro policristalino, o valor de densidade de carga relacionada a formação de óxido é de $390 \mu\text{C cm}^{-2}$ (S. TRASATTI E O. A. PETRII, 1991), pode-se calcular a área ativa.

Para o voltamograma ilustrado na Figura 11, os valores de A_{ativa} e f_r foram calculados em $0,1239 \text{ cm}^2$ e $3,9$ (considerando $A_{\text{geom}} = 0,0314 \text{ cm}^2$), respectivamente. Essa etapa de determinação da área ativa foi realizada em todas os experimentos de replicata da modificação do eletrodo, pois esse valor numérico foi utilizado para os tratamentos dos resultados de impedância que serão abordados posteriormente. A importância dessa etapa justifica-se pelo fato de que, em todas as medidas de impedância os gráficos precisam ser normalizados pelo valor da área ativa, já que após finalizar cada modificação, o eletrodo é reutilizado e passa por um novo ciclo de limpeza e modificações resultando em um valor de área ativa diferente.

Figura 11 - Voltamograma cíclico a 100 mVs^{-1} do eletrodo de ouro policristalino em solução $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de H_2SO_4 a $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

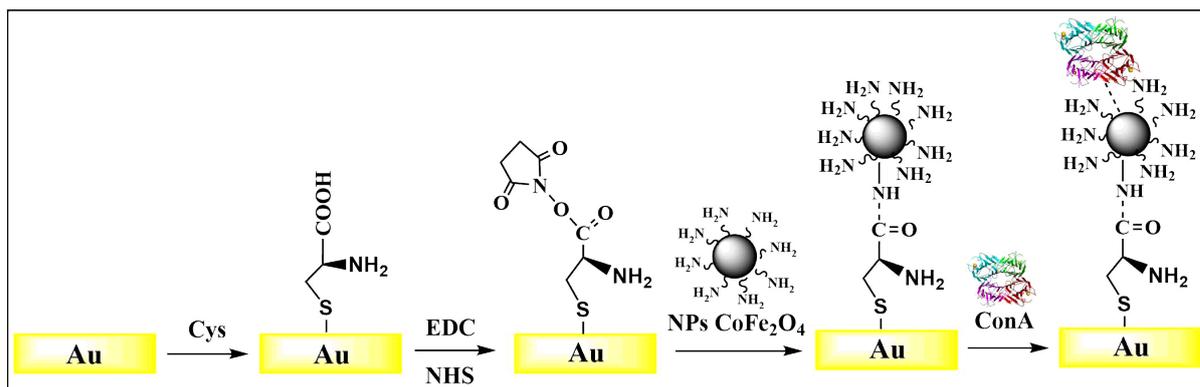


3.5.3 Modificação do eletrodo de ouro

Após as etapas de limpeza e determinação da área ativa do eletrodo, foi realizado o procedimento de formação das monocamadas automontadas para, assim, gerar a plataforma visando a detecção de bactérias. Depois de cada etapa de modificação, descritas na Figura 12, o eletrodo foi caracterizado por VC e EIE. Inicialmente, para a formação do eletrodo Au/Cys/NHS, foi utilizada a metodologia baseada no trabalho de Özcan e colaboradores (ÖZCAN et al., 2014), conforme descrição a seguir: imersão do eletrodo de ouro limpo em uma solução de cisteína (Cys, 50 mmol L^{-1}) por 12 h formando a superfície Au/Cys. Após lavagem, o eletrodo Au/Cys foi imerso por 1 h em uma solução contendo $0,04 \text{ mmol L}^{-1}$ do reticulador heterobifuncional N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida hidrocloreto (EDC) e $0,01 \text{ mmol L}^{-1}$ de N-hidroxisulfosuccinimida (NHS). Em seguida, o eletrodo denominado Au/Cys/NHS foi lavado e imerso em uma dispersão aquosa contendo as NPs de $\text{CoFe}_2\text{O}_4@ \text{NH}_2$ ($0,05 \text{ mg mL}^{-1}$) por 24 h. É importante ressaltar a necessidade de sonicar as NPs antes da imersão do eletrodo para que as mesmas permaneçam dispersas no meio aquoso. O eletrodo denominado Au/Cys/NHS/NPs foi lavado e imerso em uma solução tampão fosfato (PBS 10 mmol L^{-1} , pH 7,4) contendo a lectina ConA ($0,1 \text{ mg mL}^{-1}$) por 24 h formando o eletrodo

Au/Cys/NHS/NPs/ConA. O esquema de modificação do substrato de ouro contendo todas as etapas de modificação é apresentado na Figura 12.

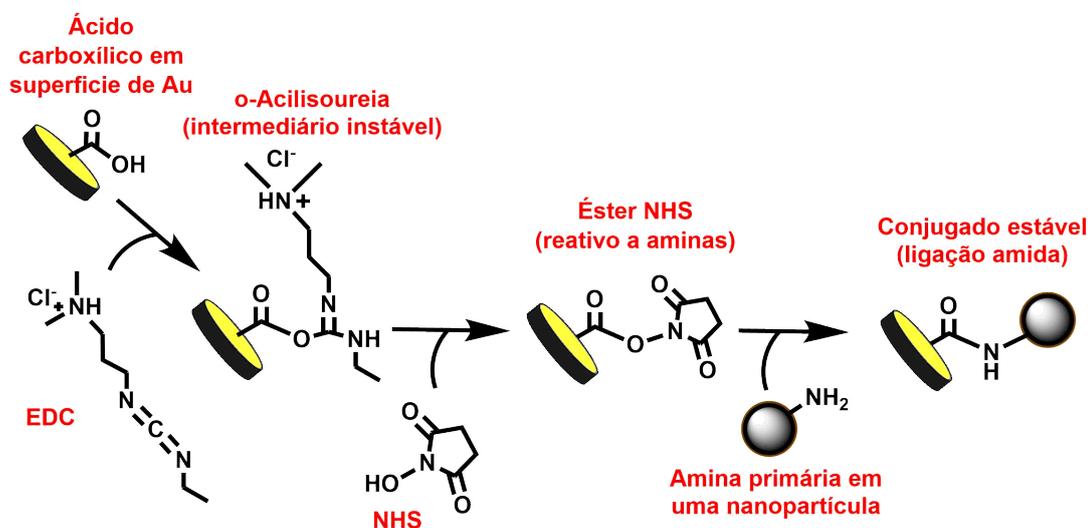
Figura 12 – Etapas de modificação do eletrodo de ouro com cisteína (Cys), N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida hidrocloreto (EDC) e N-hidroxisulfosuccinimida (NHS), NPs $\text{CoFe}_2\text{O}_4@NH_2$ e ConA para a formação do eletrodo Au/Cys/NHS/NPs/ConA.



Fonte: Elaborado pelo autor. (Fora de escala)

Para mostrar com mais detalhes a etapa de modificação com EDC/NHS, a Figura 13 apresenta um esquema geral da reação de reticulação com os compostos EDC (carbodiimida) e NHS (N-hidroxisuccinimida) que foram utilizados nesse trabalho para possibilitar a imobilização das nanopartículas funcionalizadas com grupos amina na superfície do eletrodo de Au modificado com cisteína. O NHS é constantemente introduzido em protocolos de acoplamento com EDC para melhorar a eficiência da reação ou gerar intermediários estáveis a seco (que são reativos a aminas). O EDC acopla NHS a carboxilas produzindo um éster NHS que é significativamente mais estável do que o intermediário *o*-acilissoureia proporcionando, dessa forma, uma conjugação efetiva com aminas primárias em pH fisiológico e formando, por fim, um conjugado estável através da ligação amida (THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2022).

Figura 13 - Esquema da reação de reticulação carboxil-amina usando o EDC e NHS.



Fonte: Adaptada da referência (THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2022).

3.5.4 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE)

Os experimentos de impedância foram realizados após cada etapa de modificação do eletrodo (descritas na sessão 3.5.3). As medidas foram feitas na faixa de frequência de 0,1 Hz a 30 kHz com amplitude de perturbação de 20 mV. As análises foram obtidas em solução de KCl 0,1 mol L⁻¹ contendo 2,5 mmol L⁻¹ dos íons complexos [Fe(CN)₆]³⁻ e [Fe(CN)₆]⁴⁻ como espécies redox ativas. Foi empregado o método de potencial de circuito aberto (OCP, do inglês *Open Circuit Potential*) para definir o potencial aplicado ao eletrodo de trabalho em relação a valores próximos do equilíbrio do par redox Fe^{II/III}.

3.5.5 Detecção das bactérias *E. coli*

Os eletrodos modificados com lectina ConA foram testados para detecção das bactérias *E. coli* BL21(DE3), sendo realizadas medidas em sequência de VC e EIE. O eletrodo denominado Au/Cys/NHS/NPs/ConA foi imerso por 15 min em uma solução tampão fosfato (PBS 10 mol L⁻¹, pH 7,4) contendo diferentes concentrações de *E. coli* (1,7 × 10¹, 8,3 × 10², 8,3 × 10³, 8,3 × 10⁴ UFC/mL). As medidas foram realizadas em triplicata em três eletrodos separados para cada uma das concentrações a fim de obter a repetibilidade das medidas e confiabilidade do biossensor. As soluções de *E. coli* foram preparadas por uma série de diluições em tampão fosfato, sendo que foram realizados alguns testes preliminares e medidas de impedância antes de definir as concentrações para a detecção e construção da

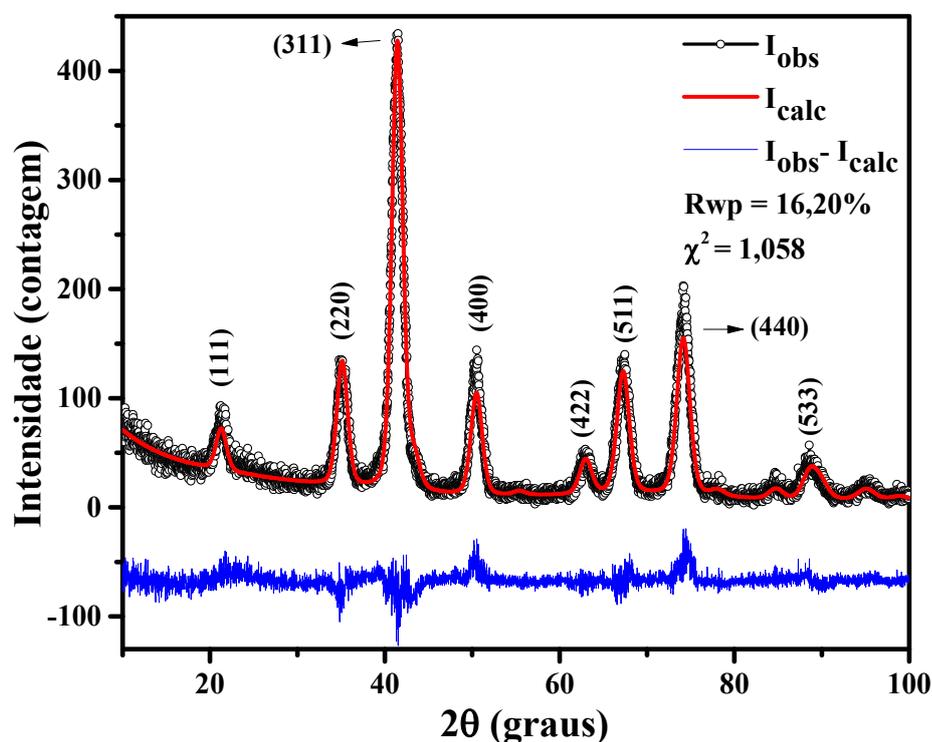
curva de calibração. Todas as medidas eletroquímicas foram feitas a temperatura ambiente (25 °C).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Difração de Raios X

Os difratogramas de raios X em pó foram obtidos para fornecer informações sobre a estrutura cristalina do material sintetizado. A amostra sintetizada foi identificada com a fase de ferrita de cobalto (CoFe_2O_4) apresentando sistema cristalino hexagonal e grupo espacial R-3m. Foi realizado o refinamento pelo método de Rietveld a partir do difratograma da ferrita obtido no banco de dados COD (código 1540973) (SHIN; LEE; KNOW, 1994). O difratograma ilustrado na Figura 14 mostra o perfil dos picos observados e calculados, além da diferença entre ambos, com a atribuição dos principais picos de difração. Os valores de Rwp e χ^2 são apresentados pois são informações importantes que se referem a qualidade do refinamento e serão definidos posteriormente.

Figura 14 – Difratograma de raios X para a amostra de NPs de CoFe_2O_4 incluindo o difratograma calculado (vermelho), observado (preto) e a diferença entre ambos (azul).



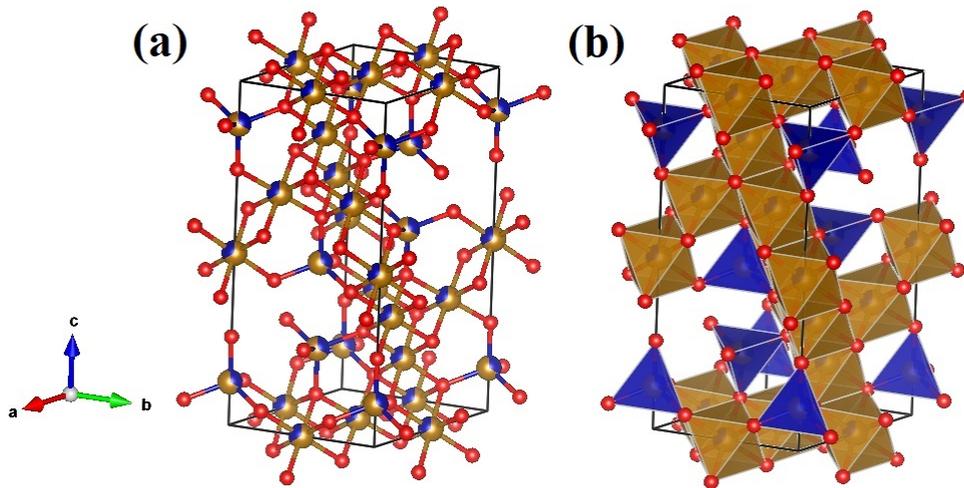
Os picos de difração centrados em 2θ observados no difratograma apresentado na Figura 14 são característicos de fase única de CoFe_2O_4 com estrutura hexagonal compactada e indicam esse material como único produto da reação, ou seja, não há contaminação da fase de óxido de ferro ou qualquer outra impureza (BASTIANELLO; GROSS; ELM, 2019; SHAHJUEE; MORTEZA MASOUDPANAH; MOHAMMAD MIRKAZEMI, 2017; SWATSITANG et al., 2016; PURNAMA et al., 2015). Os parâmetros de rede obtidos no refinamento para a amostra de CoFe_2O_4 sintetizada são mostrados na Tabela 1, nela é mostrado uma comparação entre os valores calculados e os valores de referência (SHIN; LEE; KNOW, 1994). Sendo que foi observado valores muito similares com o reportado na literatura, com baixo desvio padrão para cada parâmetro, reforçando assim a qualidade do refinamento.

Tabela 1 - Comparação entre parâmetros de rede obtidos no refinamento e os de referência.

Parâmetros	Observado	Referência: SHIN; LEE; KNOW, 1994	σ
a (Å)	5,9309	5,9370	0,0007
b (Å)	5,9309	5,9370	0,0007
c (Å)	14,6127	14,5430	0,0035
α (°)	90	90	0
β (°)	90	90	0
γ (°)	120	120	0
V (Å ³)	445,16	443,93	0,102
d (g/cm ³)	5,25	5,26	-

A estrutura cristalina das NPs CoFe_2O_4 que foram sintetizadas é apresentada na Figura 15 (as imagens são geradas usando o software VESTA) sendo consistente com uma estrutura hexagonal compactada (hcp). Esse tipo de estrutura contém sítios intersticiais octaédricos (sítios O) e sítios intersticiais tetraédricos (sítios T) (SHOHOJI, 2013), sendo que os íons Fe^{3+} ocupam todos os sítios tetraédricos e metade dos octaédricos. Já os íons de Co^{2+} ocupam metade dos sítios octaédricos (GORBACHEV et al., 2021; SMIT; WIJN, 1959).

Figura 15 - Estrutura cristalina das NPs CoFe_2O_4 , (a) modelo de bola e bastão onde as esferas pequenas representam os átomos de oxigênio e as esferas grandes representam os átomos de cobalto ou ferro; (b) modelo poliédrico contendo os sítios tetraédricos e octaédricos dentro da estrutura cristalina.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Dois parâmetros permitem avaliar a eficiência do refinamento para atribuição da estrutura cristalina. O erro residual do processo de refinamento (Rwp), determinado pelo método dos mínimos quadrados, indica confiabilidade quando se obtém valores inferiores a 20%. A razão entre o valor de Rwp e o erro estatístico associado às medidas de intensidade (χ^2) é outro parâmetro de avaliação de acurácia nos protocolos de refinamento (YOUNG, R. A, 1993). Valores de χ^2 entre 1,0 e 1,6 apontam para um nível adequado de refinamento (H. SAISHO; Y. GOHSHI, 1996). Neste trabalho, os valores de Rwp e χ^2 foram calculados em 16,20% e 1,058 respectivamente, indicando que o refinamento foi satisfatório.

Para determinar o tamanho das partículas da amostra, foi utilizado o método de Scherrer (CULLITY, B. D, 1978), onde o tamanho médio dos cristalitos (d_m) foi calculado a partir das medidas de largura a meia altura do pico (β), dada em radianos, correspondente à linha de reflexão de maior intensidade do difratograma, de acordo com a Equação 1:

$$d_m = \frac{k \cdot \lambda}{\beta \cdot \cos\theta} \quad (1)$$

Onde k é o fator de correlação que depende da forma da partícula (0,9 para partículas esféricas), λ é o comprimento de onda (em nm) dos raios X que foi usado na

medida, e θ é o ângulo de difração de Bragg do pico com maior intensidade relativa (100%). Quanto menor for a largura dos picos no difratograma, maior será o tamanho médio das partículas. Sendo assim, a largura à meia altura do pico de difração de maior intensidade está relacionada com o diâmetro médio das partículas. O valor médio de tamanho das partículas calculado a partir do difratograma de raios X usando o método de Sherrer foi de $7,44 \pm 0,04$ nm. Como se verá a seguir, outras técnicas podem ser empregadas para o cálculo de d_m permitindo uma avaliação comparativa com o resultado apresentado.

4.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

As imagens de baixa e alta resolução resultantes do contraste gerado por um feixe de elétrons sobre um determinado material, permite que a técnica de microscopia eletrônica de transmissão forneça informações sobre o tamanho e a morfologia de nanomateriais. As Figuras 16 e 17 apresentam as imagens de MET obtidas para as amostras CoFe_2O_4 e $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{NH}_2$ e os histogramas de distribuição de tamanho, respectivamente. A contagem das NPs foram realizadas em várias imagens diferentes, para totalizar mais de 100 partículas. No Anexo, foi incluído imagens para as duas amostras em uma escala maior (100 nm), que também foram utilizadas durante a contagem das partículas.

Figura 16 – Imagens de MET das NPs CoFe_2O_4 (A) e $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{NH}_2$ (B).

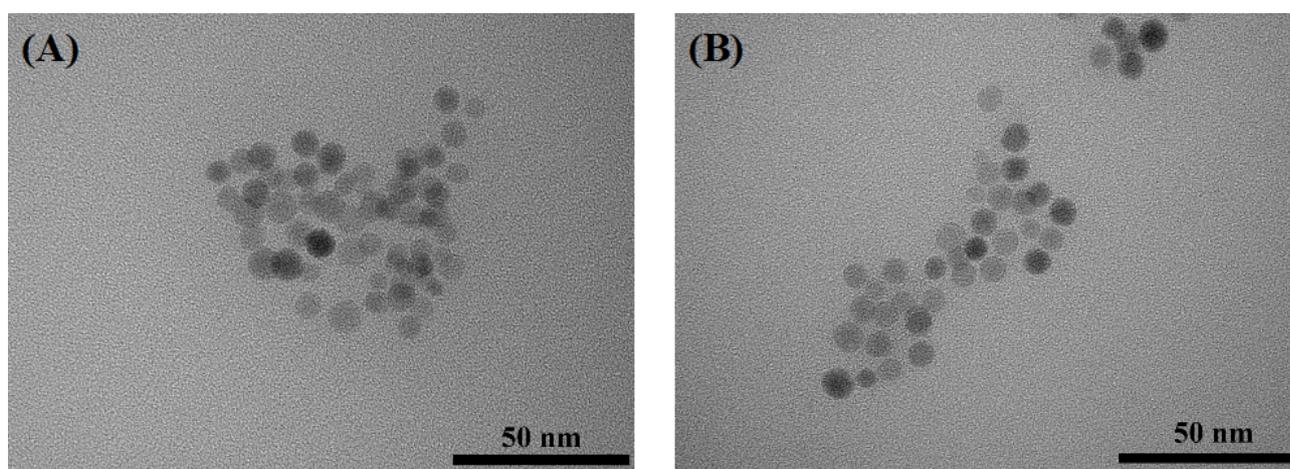
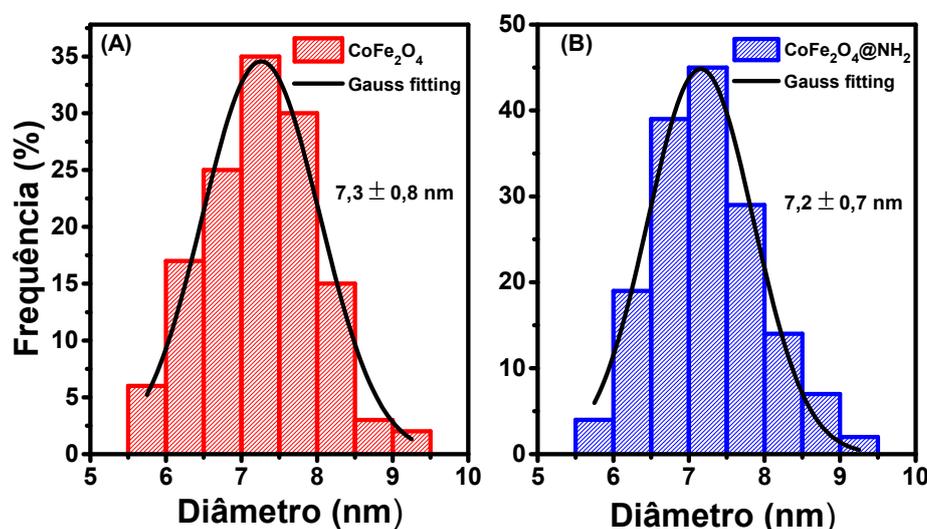


Figura 17 - Gráficos de distribuição de tamanhos para as NPs de CoFe_2O_4 (A) e $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{NH}_2$ (B).



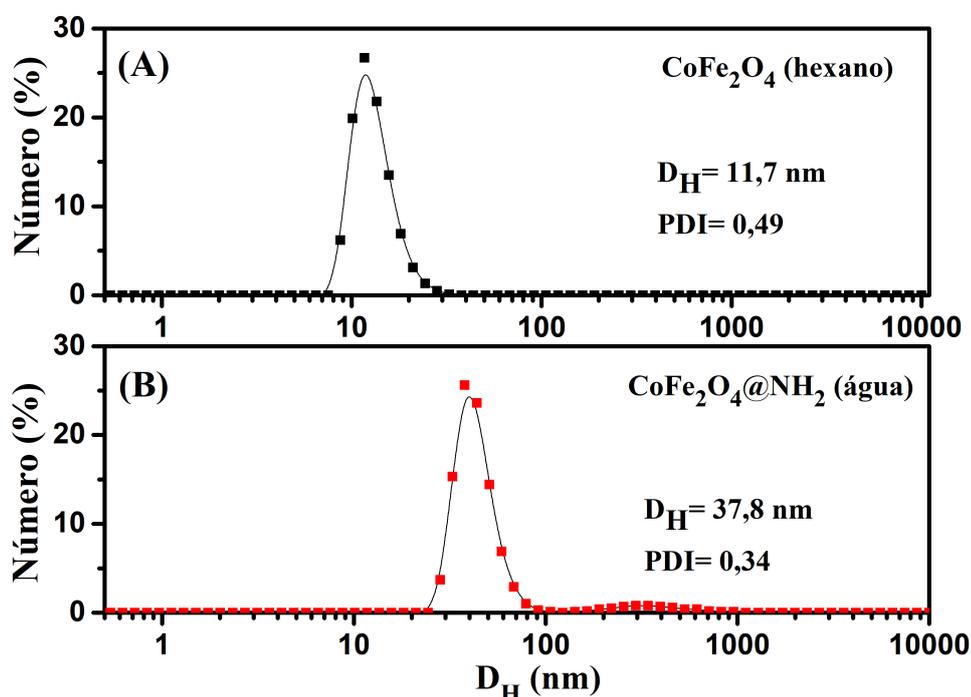
Para a amostra de CoFe_2O_4 , a imagem de MET indica boa uniformidade de tamanho com partículas de formas aproximadamente esféricas e diâmetro médio de $D_{\text{TEM}} = 7,3 \text{ nm} (\pm 0,8 \text{ nm})$ sendo próximo àquele calculado pela equação de Scherrer ($7,44 \text{ nm}$). Para a amostra de $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{NH}_2$, após a modificação com APTES, a imagem indica a manutenção da forma esférica e ausência de deformação ou crescimento significativo. O histograma resultou em um diâmetro médio de $7,2 \text{ nm} (\pm 0,7 \text{ nm})$. Esse resultado sugere que a modificação ocorre na superfície das NPs, sem gerar uma camada espessa de sílica. As imagens obtidas por MET, são capazes de fornecer informações somente sobre o núcleo inorgânico do nanomaterial não podendo ser usado, portanto, para análise do revestimento orgânico (APTES) devido à transparência desses materiais relativamente à técnica em questão (DE PALMA et al., 2007). A transparência eletrônica está diretamente relacionada ao tamanho dos átomos. Elementos de número atômicos elevados são mais densos e menos transparentes ao feixe transmitido, difratam mais pronunciadamente o feixe e observa-se regiões mais escuras, diferente de materiais orgânicos que são mais leves, onde observa-se regiões claras já que o feixe atravessa a amostra (ZHANG; HE; GU, 2006). Para obter informações que permitam avaliar a funcionalização das NPs com APTES, realizou-se experimentos de DLS cujos resultados serão apresentados a seguir.

4.3 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

Os diâmetros hidrodinâmicos das NPs de CoFe_2O_4 e $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{NH}_2$ foram analisados pela técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS) utilizando suspensões diluídas (aproximadamente $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$). Essa técnica fornece a média da intensidade de espalhamento de luz em função do tempo das partículas suspensas em solvente líquido sob movimento browniano para obter a distribuição dos diâmetros hidrodinâmicos (D_H). Esses diâmetros, por sua vez, podem ser registrados em função da intensidade, volume ou número de partículas. O diâmetro hidrodinâmico é um dado relevante, pois permite estimar o raio da partícula em suspensão considerando, não apenas o tamanho isolado da partícula, mas também a região difusa de cargas formadas por contra-íons (influência da força iônica do meio) e pela camada de hidratação (XU, 2008).

Nos gráficos de distribuição dos diâmetros hidrodinâmicos por número de partículas, Figura 18, apenas uma distribuição de tamanhos foi observada para cada amostra. Para as NPs CoFe_2O_4 dispersas em hexano (já que são dispersas somente em meio orgânico), o D_H observado foi de 11,70 nm. Após a modificação com sílica, foi possível dispersar as NPs em água, e o valor de D_H foi observado em 37,84 nm.

Figura 18 - Gráfico da distribuição percentual do número de partículas em função de D_H para as NPs de (A) CoFe_2O_4 e (B) $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{NH}_2$.



O resultado de DLS para as NPs CoFe_2O_4 (11,70 nm) apresentou uma diferença significativa em relação ao tamanho obtido por MET (7,3 nm). De fato, tal diferença era esperada e pode ser explicada pela presença dos surfactantes (ácido oleico e oleilamina) na superfície das NPs, já que o tamanho medido pela técnica de DLS considera, também, as moléculas presentes na superfície do material. Isso indica uma coerência com o resultado obtido por MET que fornece o “diâmetro verdadeiro” das partículas (LIM et al., 2013) podendo, assim, ser considerado o tamanho de 7,3 nm para o núcleo magnético e a diferença de 4,4 nm associada aos surfactantes presentes como uma monocamada contínua ao redor de cada NP. As medidas de DLS não são capazes de diferenciar materiais orgânicos de inorgânicos, fazendo, apenas, a medida do tamanho total das partículas. Por esse motivo, o tamanho calculado por essa técnica, geralmente, é maior do que aquele determinado por MET (LIM et al., 2013; DE PALMA et al., 2007).

Os valores médios de D_H das NPs recobertas com sílica foram bem maiores do que aqueles observados para as NPs de ferrita não recobertas, sendo um indicativo de que houve, efetivamente, a formação de uma fina camada de sílica. Em geral, as nanopartículas revestidas com sílica apresentam um tamanho maior que as NPs puras (LIU et al., 2015). Portanto, o aumento no valor de D_H é atribuído à formação de monocamadas polimerizadas dos silanos (APTES) em conjunto com a camada de solvatação (LIU et al., 2015).

O índice de polidispersão (PDI) é a medida da heterogeneidade de uma amostra com base no tamanho, podendo ocorrer polidispersidade devido à agregação ou aglomeração das partículas durante a análise ou devido à sua distribuição de tamanho. É estabelecido que valores de $\text{PDI} < 0,05$ costumam ser mais comuns para amostras altamente monodispersas, enquanto valores $> 0,7$ são associados à distribuição de partículas polidispersas (MUDALIGE et al., 2019). Excetuando-se amostras padrões altamente monodispersas, valores menores que 0,05 são raramente observados. Valores de PDI muito altos (próximos de 1), como no caso de amostras polidispersas, são considerados suspeitos não sendo, portanto, adequados para esse tipo de análise e não apresentando confiabilidade nas medidas de DLS (RAVAL et al., 2019). Os valores de PDI obtidos neste trabalho, foram de 0,49 e 0,34 para as NPs antes e após o recobrimento com APTES, respectivamente, indicando que as partículas sintetizadas pelo método do poliálcool modificado são monodispersas (já que apresentam valores de $\text{PDI} < 0,7$) e que é mantida essa monodispersão após o recobrimento com o silano.

4.4 Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho (IV)

As nanopartículas sintetizadas neste trabalho foram analisadas por espectroscopia vibracional na região do infravermelho para inferir sobre a presença de moléculas dos surfactantes e APTES sobre a superfície. O espectro infravermelho (IV) das NPs de CoFe_2O_4 e $\text{CoFe}_2\text{O}_4@NH_2$ são mostrados na Figura 19 e as tentativas de atribuições das principais bandas encontram-se resumidas na Tabela 2.

Figura 19 – Espectros vibracionais na região do infravermelho das amostras de NPs de CoFe_2O_4 (linha preta) e $\text{CoFe}_2\text{O}_4@NH_2$ (linha vermelha) obtidos em pastilha de KBr.

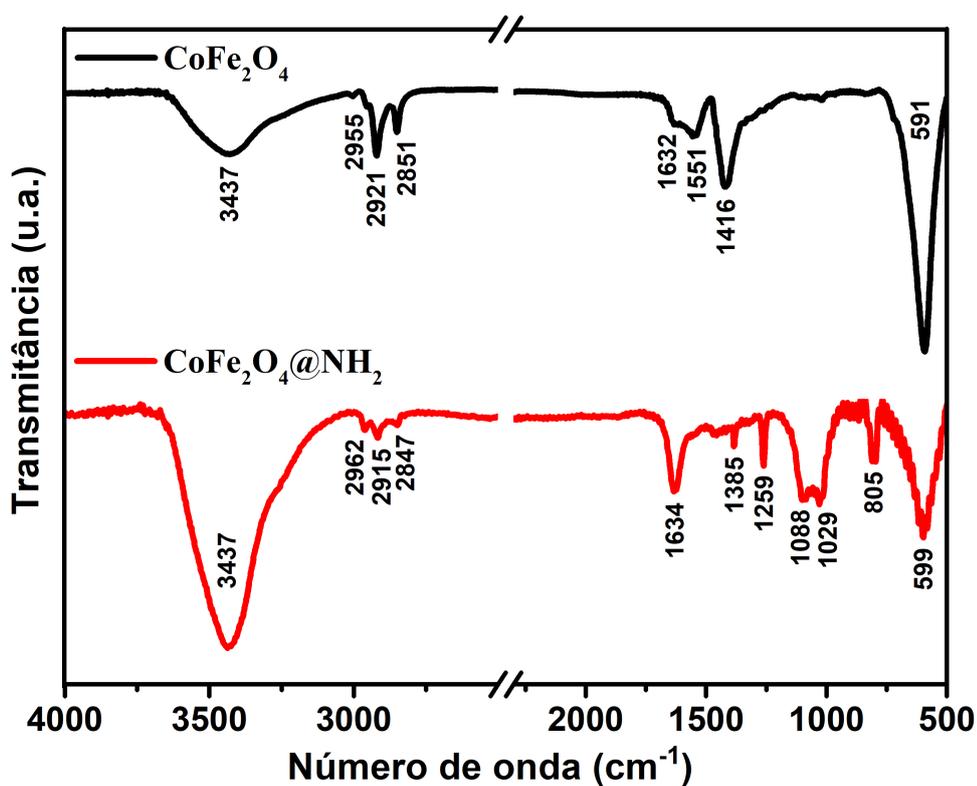


Tabela 2 – Tentativa de atribuição dos principais modos vibracionais observados para as NPs de CoFe_2O_4 e $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{NH}_2$.

Número de onda (cm^{-1})		Tentativa de atribuição	Referências
CoFe_2O_4	$\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{NH}_2$		
3437	3437	$\nu(\text{O-H}) + \nu(\text{N-H})$	LIU et al., 2015; DE PALMA et al., 2007
2955	2962	$\nu_a(\text{CH}_3)$	ZHANG; HE; GU, 2006
2921 e 2851	2915 e 2847	$\nu_a(\text{CH}_2)$ e $\nu_s(\text{CH}_2)$	YE; ZHAO; DOU, 2018; BLOEMEN et al., 2012
1632	1634	$\delta(\text{NH}_2) + \delta(\text{O-H})$	DE PALMA et al., 2007; SODIPO; AZIZ, 2014
1551 e 1416	—	$\nu_a(\text{COO}^-)$ e $\nu_s(\text{COO}^-)$	DE PALMA et al., 2007; LIMAYE et al., 2017
—	1385	$\nu(\text{C-N})$	DE PALMA et al., 2007
—	1259	$\nu(\text{Si-C})$	BLOEMEN et al., 2012
—	1088-1029	$\nu(\text{Si-O-R})$	ARKLES; JR; ANDERSON, 1984; LI et al., 2010
—	805	$\omega(\text{NH}_2)$	DE PALMA et al., 2007
591	599	$\nu(\text{Fe-O})$	WALDRON, R, 1955; YAMAURA et al., 2004

vs - estiramento simétrico; ν_a - estiramento assimétrico; δ - deformação angular simétrica no plano; ω - deformação angular simétrica fora do plano.

A banda em 3437 cm^{-1} no espectro das NPs de CoFe_2O_4 , linha preta na Figura 19, corresponde aos modos vibracionais de estiramento das ligações OH, $\nu(\text{O-H})$, e NH, $\nu(\text{N-H})$, presentes nas estruturas dos surfactantes ácido oleico e oleilamina (estruturas mostradas na Figura 8), respectivamente (SHUKLA et al., 2003). O aumento de intensidade dessa banda no espectro das NPs de $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{NH}_2$ (curva em vermelho) é atribuído à presença das moléculas de APTES e a grande quantidade de grupos amino livres na superfície das partículas (LIU et al., 2015; DE PALMA et al., 2007). Na região entre 2960 e 2850 cm^{-1} são observadas, nos espectros das duas amostras, bandas características de modos de estiramentos simétricos e assimétricos de grupos $-\text{CH}_3$ e $-\text{CH}_2$ (ZHANG et al., 2012; YE; ZHAO; DOU,

2018) presentes na estrutura do APTES e que, também, estão presentes nas estruturas do ácido oleico e oleilamina das NPs de CoFe_2O_4 (ZHANG; HE; GU, 2006; BLOEMEN et al., 2012).

A banda em 1634 cm^{-1} é atribuída à deformação angular simétrica no plano dos grupos aminos do APTES, $\delta(\text{NH}_2)$, e deformação angular de ligações —OH . A mesma banda aparece em 1632 cm^{-1} para as NPs sem o recobrimento de sílica devido à presença dos agentes de superfície (ácido oleico e oleilamina) que foram utilizados para estabilização da ferrita de cobalto e que, também, apresentam os modos vibracionais dos grupos —OH e —NH_2 , porém com menor intensidade (DE PALMA et al., 2007). As bandas em 1632 e 3430 cm^{-1} podem se sobrepor com bandas provenientes dos modos vibracionais de estiramento e deformação da água presente no material devido à adsorção de moléculas de água na superfície das NPs $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{NH}_2$ via ligação de hidrogênio (SODIPO; AZIZ, 2014).

As bandas características dos estiramentos dos grupos carboxilatos, $\nu_a(\text{COO}^-)$ e $\nu_s(\text{COO}^-)$, presentes no ácido oleico usado como estabilizante na síntese das nanopartículas, são observadas em 1551 e 1416 cm^{-1} , respectivamente. A diferença entre as posições desses modos vibracionais ($\Delta\nu = 135\text{ cm}^{-1}$) sugere que a coordenação dos grupos carboxilatos com o metal ocorre na forma bidentada, pelos dois átomos de oxigênio (MCAFEE, 2000). O desaparecimento dessas bandas após o revestimento com a sílica APTES é um forte indicativo de que o procedimento de troca de ligantes foi eficiente, tornando hidrofílicas as NPs originalmente hidrofóbicas (DE PALMA et al., 2007; LIMAYE et al., 2017).

No espectro das NPs de $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{NH}_2$ (curva em vermelho), um pequeno ombro que aparece em 1568 cm^{-1} é atribuída à deformação da ligação N—H (DE PALMA et al., 2007) dos grupos amino protonados $\delta(\text{NH}_3^+)$. Essa protonação pode ocorrer devido à presença de ácido acético usado como catalisador na reação de revestimento das NPs (BLOEMEN et al., 2012). Outra banda bem discreta em intensidade aparece em 1455 cm^{-1} , sendo referente à deformação angular dos grupos metilenos, $\delta(\text{CH}_2)$, do APTES (ZIRAK et al., 2018) enquanto aquela em 1385 cm^{-1} é atribuída ao estiramento da ligação CN , $\nu(\text{C—N})$ (DE PALMA et al., 2007), das moléculas do silano. Já a banda bem definida em 1259 cm^{-1} está associada ao estiramento da ligação Si—C (BLOEMEN et al., 2012).

A diferença mais marcante entre os espectros é observada pelo conjunto de bandas na região entre 1088 e 1029 cm^{-1} que é característico das camadas de sílica condensadas na superfície da NPs, sendo atribuídas a modos vibracionais de estiramento das ligações Si—O—Si (ARKLES; JR; ANDERSON, 1984; LI et al., 2010). A banda em 805 cm^{-1} , por sua vez, é

atribuída à deformação angular simétrica fora do plano dos grupos amino, $\omega(\text{NH}_2)$ (BLOEMEN et al., 2012; DE PALMA et al., 2007).

A banda de forte intensidade observada em 591 cm^{-1} no espectro das NPs de CoFe_2O_4 (curva em preto), corresponde aos modos vibracionais de estiramento da ligação FeO , $\nu(\text{Fe—O})$, do núcleo da ferrita (WALDRON, R, 1955). Após a troca de ligante, foi observado um deslocamento para 599 cm^{-1} e leve alargamento dessa banda devido à formação de ligações Fe—O—Si (YAMAURA et al., 2004). Além disso, foi observada uma diminuição de intensidade indicando a eficiência do revestimento do material em relação à proteção contra oxidação, sendo essa redução da intensidade um efeito de diluição da massa devido à presença do material orgânico. Por fim, as bandas de baixa intensidades observadas na região de 1120 a 1043 cm^{-1} no espectro das NPs de CoFe_2O_4 podem ser atribuídas aos modos vibracionais de estiramento das ligações C—C e deformação angular assimétrica fora do plano dos grupos metilenos, $\tau(\text{CH}_2)$, dos surfactantes (CANNAS et al., 2010; WALDRON, R, 1955).

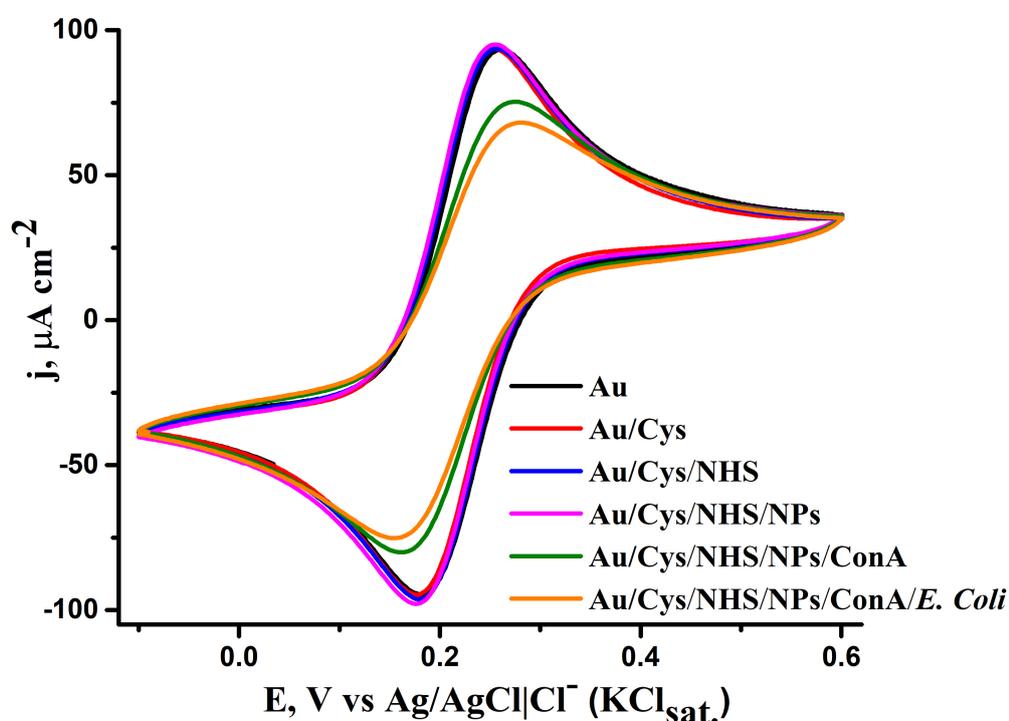
4.5 Modificação do eletrodo de ouro e detecção de *E. coli*

As etapas de modificação do eletrodo de ouro ocorreram de forma espontânea, apenas por imersão do substrato, tal como ilustrado na Figura 12. As técnicas de VC e EIS foram usadas para acompanhar todas essas etapas usando, como espécie redox ativa, os íons complexos $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ e $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ em solução de KCl. Esses complexos apresentam respostas eletroquímicas e impedimétricas bem definidas, permitindo a correlação das respostas obtidas com a composição e/ou organização das moléculas adsorvidas sobre a superfície de ouro (ROCK, 1966; VOGT et al., 2016). A Figura 20 mostra os voltamogramas cíclicos obtidos após cada etapa de modificação do eletrodo de ouro até a etapa de imobilização de *E. Coli*.

As ondas observadas nos voltamogramas apresentados na Figura 20 são atribuídas ao par redox $\text{Fe}^{\text{III/II}}$ do íon complexo $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ em solução. Para o eletrodo de ouro não modificado (curva preta), a diferença entre os potenciais de pico de oxidação (E_{pa}) e redução (E_{pc}) ($\Delta E_{\text{p}} = 79\text{ mV}$), bem como a razão entre as correntes de pico anódica (i_{pa}) e catódica (i_{pc}) ($i_{\text{pa}}/i_{\text{pc}} = 0,98$) indicam um comportamento quasi-reversível do processo redox estudado. Tal resultado é consistente com trabalhos anteriores, considerando as mesmas condições

experimentais (PAULO; DIÓGENES; ABRUÑA, 2011; MENON; KUMAR, 2017; ÖZCAN et al., 2014; SIMÃO et al., 2020).

Figura 20 - Voltamogramas cíclicos do eletrodo de ouro limpo (curva preta) e após modificação com cisteína (Au/Cys, curva vermelha), cisteína ativada com NHS (Au/Cys/NHS, curva azul), NPs de $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{NH}_2$ (Au/Cys/NHS/NPs, curva magenta), ConA (Au/Cys/NHS/NPs/ConA, curva verde) e imersão por 15 min em solução contendo *E. coli* ($8,3 \times 10^4$ UFC/mL). Curvas obtidas a $0,05 \text{ V s}^{-1}$ em solução de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ contendo $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$.



Os voltamogramas obtidos para o eletrodo de ouro após modificação com moléculas de cisteína (Au/Cys), curva vermelha, acoplamento com EDC/NHS (Au/Cys/NHS), curva azul, e incorporação das NPs de $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{NH}_2$ (Au/Cys/NHS/NPs), curva magenta, não apresentaram diferença significativa comparativamente ao eletrodo de ouro não modificado. Para os eletrodos Au/Cys e Au/Cys/NHS, esse resultado é atribuído à presença de defeitos na monocamada que geram sítios não recobertos ou poros através dos quais as moléculas de prova passam e atingem a superfície do eletrodo onde ocorre a reação heterogênea de transferência de elétrons (hTE). A presença de sítios não recobertos em monocamadas de moléculas sulfuradas é frequentemente reportada sendo atribuída à repulsão

entre as moléculas adjacentes e permitindo assim a transferência de carga (CEA et al., 2016; MENDES et al., 2004).

Já a similaridade de perfil voltamétrico observada entre o eletrodo não modificado e o eletrodo Au/Cys/NHS/NPs pode ser atribuída ao aumento de condutividade elétrica fornecida pelas nanopartículas magnéticas (RIU; GIUSSANI, 2020; KAYA et al., 2021). Como será observado posteriormente na Tabela 3, o fato da modificação do eletrodo de Au até a etapa de imobilização das NPs não afetar significativamente o perfil voltamétrico é explicitado pela similaridade entre os valores de ΔE_p . Ressalte-se que a incorporação das NPs sobre o eletrodo Au/Cys/NHS ocorre a partir da formação de ligações amidas entre os grupos éster NHS e NH_2 da superfície das NPs (ÖZCAN et al., 2014), como já foi comentado na sessão 3.5.3. Já a imobilização da lectina *Concanavalin A* (ConA) formando o eletrodo Au/Cys/NHS/NPs/ConA, se dá por interações eletrostáticas (SIMÃO et al., 2020). Após a imobilização da proteína, a curva voltamétrica (curva verde) apresenta uma mudança significativa de perfil com diminuição nos valores das correntes de pico e afastamento entre os potenciais de pico como resposta à imobilização da lectina. Esse resultado indica que a proteína exerce um efeito de bloqueio em relação à reação hTE das espécies de prova redox (SIMÃO et al., 2020). Resultados similares foram reportados para eletrodos modificados com Cys/ZnONPs/ConA e Fe_3O_4 NPs/ConA (SIMÃO et al., 2020; DUTTA et al., 2018; DA SILVA et al., 2014).

O eletrodo modificado apresenta, ainda, uma mudança de perfil após imersão em solução de *E. coli* (curva amarela) com uma diminuição nas correntes de pico atribuída à interação da ConA com as proteínas glicosiladas presentes nas superfícies dessa bactéria (REINA et al., 2008). Esse resultado indica que a *E. coli* é capturada pela ConA mostrando que a plataforma sensora elaborada é capaz de detectar as bactérias em estudo. Perfis voltamétricos semelhantes foram obtidos para todas as modificações do eletrodo realizadas em triplicata para as quatro concentrações de *E. coli*.

A Figura 21 apresenta os diagramas de Nyquist obtidos após cada etapa de modificação do eletrodo, incluindo uma medida obtida após imersão em solução de *E. Coli* em uma das concentrações de trabalho. A Figura 22 apresenta os diagramas de Nyquist do eletrodo Au/Cys/NHS/NPs/ConA após imersão em soluções de diferentes concentrações de *E. coli* ($1,7 \times 10^1$ - $8,3 \times 10^4$ UFC/mL), iniciando com a curva da plataforma sensora formada após a modificação com ConA (curva preta).

Figura 21 – Diagramas de Nyquist para cada etapas de modificação do eletrodo e após 15 min de imersão em solução contendo *E. coli* ($1,7 \times 10^1$ UFC/mL). Solução eletrolítica: KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ contendo $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4/3-}$ $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Inseto: diagramas de Nyquist com ampliação na faixa de 0 a $100 \text{ } \Omega \text{ cm}^2$ para os eletrodos Au, Au/Cys, Au/Cys/NHS e Au/Cys/NHS/NPs.

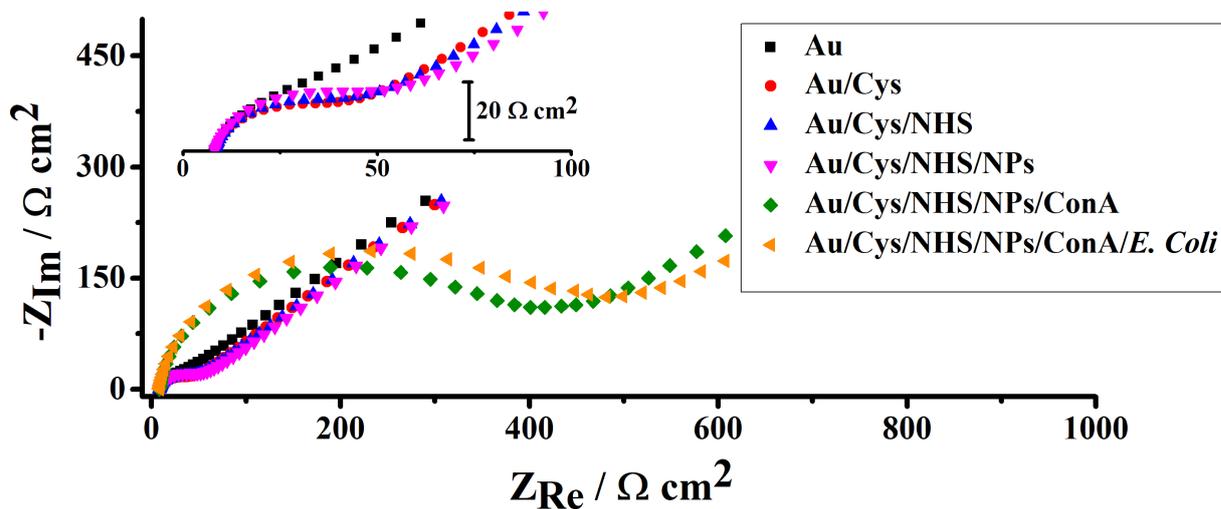
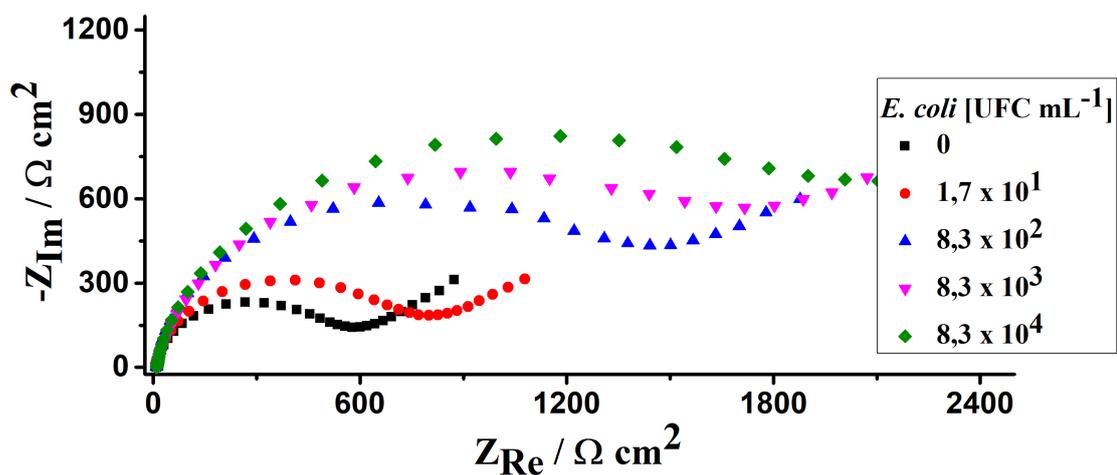


Figura 22 – Diagramas de Nyquist obtidos para o eletrodo Au/Cys/NHS/NPs/ConA e deste após 15 min de imersão em soluções de diferentes concentrações de *E. coli*. Solução eletrolítica: KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ contendo $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4/3-}$ $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$.



A Tabela 3 apresenta os parâmetros impedimétricos e eletroquímicos obtidos a partir dos resultados apresentados nas Figuras 20, 21 e 22.

Tabela 3 – Parâmetros impedimétricos e voltamétricos obtidos para o íon complexo $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ em função da superfície modificada e concentração de *E. coli*.

Eletrodo modificado	Concentração de <i>E. coli</i> /UFC mL ⁻¹	R _{CT} /Ω cm ²	θ	k _{app} /10 ⁻⁴ cm s ⁻¹	ΔE _p / mV vs Ag/AgCl
Au	-	29,73	0	35,82	79
Au/Cys	-	40,87	0,273	26,06	76
Au/Cys/NHS	-	47,79	0,378	22,29	75
Au/Cys/NHS/NPs	-	50,43	0,410	21,12	78
Au/Cys/NHS/NPs/ConA	-	532,56	0,944	1,99	114
Au/Cys/NHS/NPs/ConA/ <i>E.coli</i>	1,7 × 10 ¹	734,17	0,959	1,45	145
Au/Cys/NHS/NPs/ConA/ <i>E.coli</i>	8,3 × 10 ²	1534,95	0,981	0,69	147
Au/Cys/NHS/NPs/ConA/ <i>E.coli</i>	8,3 × 10 ³	2218,88	0,987	0,48	141
Au/Cys/NHS/NPs/ConA/ <i>E.coli</i>	8,3 × 10 ⁴	2239,25	0,987	0,47	147

R_{CT} = resistência de transferência de carga; θ = taxa de recobrimento superficial; K_{app} = constante de velocidade aparente de transferência de carga; ΔE_p = variação entre os potenciais de pico.

A taxa de recobrimento superficial (θ) e a constante de velocidade aparente de transferência de carga (k_{app}) podem ser determinadas a partir das Equações 2 e 3 (BANDYOPADHYAY et al., 1998) apresentadas abaixo:

$$\theta = 1 - \frac{R_{CT}}{R_{CT'}} \quad (2)$$

$$k_{app} = \frac{R \cdot T}{F^2 \cdot C \cdot R_{CT'}} \quad (3)$$

Em que R_{CT} e R_{CT'} são os valores de resistência de transferência de carga para os eletrodos limpo e modificado, respectivamente. R é a constante dos gases ideais (8,314 J K⁻¹ mol⁻¹), T é

a temperatura (em K), F é a constante de Faraday (96485 C mol^{-1}) e C é a concentração do par redox em solução (mol cm^{-3}).

Os valores da Tabela 3 mostram um aumento do valor de R_{CT} após cada etapa de modificação e, conseqüentemente, um aumento da taxa de recobrimento superficial (θ). Até a etapa de modificação do eletrodo com as NPs, o valor de θ observado foi de 0,410 indicando, ainda, a presença de poros ou sítios não recobertos que permitem o acesso das espécies redox ao substrato de Au. Após a etapa de modificação com a proteína ConA, o valor de θ passou para 0,944 indicando um recobrimento superficial de quase 95% e para 0,987 após a imobilização das bactérias correspondendo a um recobrimento superficial bem próximo de 100%. Além disso, as diferenças entre os valores de potencial de pico anódico e catódico (ΔE_p) é significativamente maior após a modificação com a proteína (114 mV) e a exposição à solução de bactérias, chegando a valores de até 147 mV para a concentração de $8,3 \times 10^4$ UFC/mL de *E.coli*. Esse elevado valor de θ pode estar associado a um bloqueio da monocamada pelas proteínas dificultando, assim, a transferência de elétrons (SIMÃO et al., 2020). Admitindo-se o efeito de bloqueio, este se torna mais intenso com o aumento da concentração de *E. coli* (Figura 22). Resultados similares foram reportados para outros eletrodos de Au modificados com lectinas (dentre elas a ConA) como bioreceptor para a detecção de patógenos (DA SILVA et al., 2014; LOPEZ-TELLEZ et al., 2020; RENGARAJ et al., 2018; XI et al., 2011).

Os valores de R_{CT} para o eletrodo limpo e após cada modificação (Figuras 21 e 22), foram obtidos pela extrapolação do arco formado em relação ao eixo de impedância real (Z_{Re}). A região do semicírculo observada em altas frequências representa o processo de transferência de elétrons das espécies $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$, enquanto a parte linear representa o processo de difusão das espécies redox. O valor de R_{CT} é influenciado por processos dielétricos e pela condutividade na interface eletrodo/eletrólito (ÖZCAN et al., 2014). O diagrama de Nyquist do eletrodo de ouro limpo é caracterizado por um pequeno semicírculo com baixo valor de R_{CT} ($29,73 \text{ } \Omega \text{ cm}^2$). Esse parâmetro varia para 40,87, 47,79 e $50,43 \text{ } \Omega \text{ cm}^2$ após incorporação, respectivamente, de cisteína, EDC/NHS e NPs de $\text{CoFe}_2\text{O}_4@NH_2$. Testes preliminares foram feitos previamente indicando que o tempo máximo de modificação com as NPs é de 24h, sem nenhuma mudança no valor de R_{CT} após esse tempo. Os aumentos nos valores de R_{CT} implica, conseqüentemente, na diminuição dos valores de k_{app} que muda de $35,82 \text{ } 10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$ para o eletrodo de Au limpo para $21,12 \times 10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$ após a incorporação das

NPs. Após a imobilização da lectina ConA, tem-se um aumento considerável no valor de R_{CT} ($532,56 \Omega \text{ cm}^2$) indicando a presença efetiva da lectina na plataforma nanoestruturada. Esse aumento no arco está diretamente relacionado com a elevada área superficial das partículas nanométricas, já que elas possuem uma maior superfície ativa para a incorporação dos grupos NH_2 , e conseqüentemente mais sítios que podem interagir para o reconhecimento da ConA. Deve-se ressaltar que períodos de modificação superiores a 24 h foram analisados, mas não apresentaram acréscimos de R_{CT} .

O aumento gradual de resistência indica que as etapas de modificação dificultam cada vez mais a transferência de elétrons na superfície (LASIA, 2014). Além disso, ocorre uma diminuição significativa no valor de k_{app} ($1,99 \times 10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$) após a modificação com a proteína ConA reforçando a conclusão relativa ao bloqueio à reação hTE das espécies de prova (MENDES et al., 2004; CEA et al., 2016). Os resultados mostram que a incorporação da proteína gera uma diminuição considerável na porosidade da monocamada resultando em uma cinética de transferência de elétrons entre a superfície de ouro e as espécies redox significativamente mais lenta. Esse mesmo perfil impedimétrico mostrado na Figura 21 foi obtido para todas as modificações do eletrodo realizadas em triplicata para as quatro concentrações de *E. coli*, apresentando variações significativas apenas após a imobilização da ConA e das bactérias.

Como pode ser observado na Figura 22 e na Tabela 3, o aumento da concentração de *E. coli* faz com que o valor de R_{CT} aumente gradualmente de 734,17 ($1,7 \times 10^1 \text{ UFC/mL}$) a 2239,25 $\Omega \text{ cm}^2$ para a solução mais concentrada ($8,3 \times 10^4 \text{ UFC/mL}$) indicando que a interação das bactérias com a interface contendo a lectina ConA induz um efeito de bloqueio que resulta aumento da resistência à transferência de elétrons do eletrodo (YANG et al., 2016). Esse efeito tem, como consequência, a diminuição nos constante aparente de velocidade de transferência de carga (k_{app}), de $1,45 \times 10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$ ($[E. coli] = 1,7 \times 10^1 \text{ UFC/mL}$) para $0,47 \times 10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$ ($[E. coli] = 8,3 \times 10^4 \text{ UFC/mL}$). De acordo com Yang e colaboradores, compostos glicoconjugados, denominados lipopolissacarídeos (LPS), são os sítios mais prováveis de interação de bactérias gram-negativas, como a *E. coli*, com a lectina ConA (YANG et al., 2016).

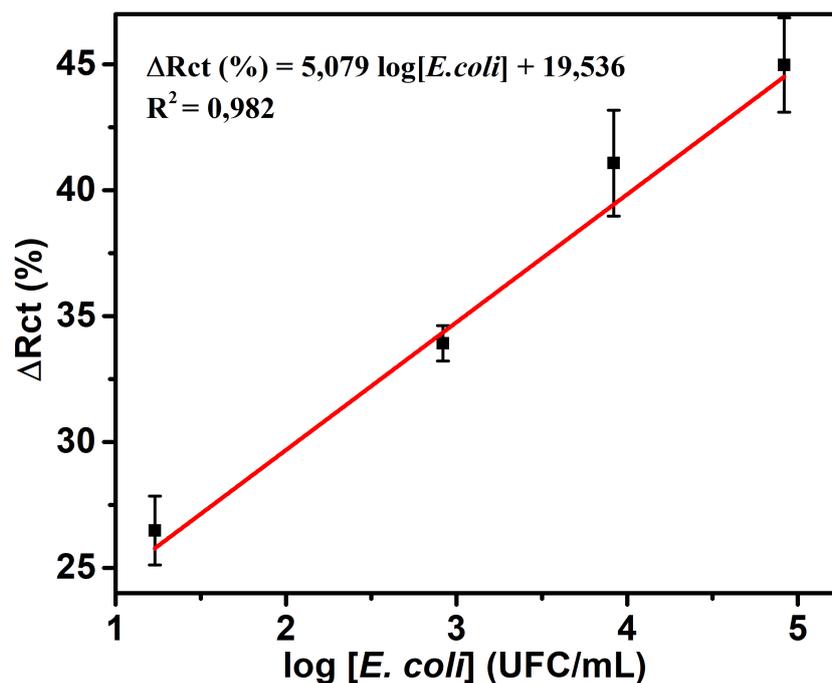
O desempenho do biosensor para detecção do patógeno foi avaliado através da variação relativa de R_{CT} ($\Delta R_{CT} \%$) seguindo protocolo reportado em vários trabalhos de desenvolvimento de biossensores eletroquímicos (DA SILVA et al., 2014; MALVANO;

PILLOTON; ALBANESE, 2020; SIMÃO et al., 2020). $\Delta R_{CT} \%$ é um componente analítico usado para medir a impedância relativa do sistema antes e depois do processo de detecção, como explicitado na Equação 4:

$$\Delta R_{CT}(\%) = \frac{R_{CT}(final) - R_{CT}(inicial)}{R_{CT}(final)} \quad (4)$$

Onde $R_{CT}(final)$ corresponde à resistência de transferência de carga da camada do sensor após a interação com a *E. coli* e $R_{CT}(inicial)$ à resistência de transferência de carga da plataforma sensora com ConA antes da modificação com a bactéria. O biossensor foi modificado em triplicata e incubado por 15 min em quatro soluções de concentrações diferentes de bactérias. Após as medidas de impedância, foi possível construir uma curva de calibração, mostrada na Figura 23, plotando os valores de $\Delta R_{CT} (\%)$ versus o logaritmo decimal das concentrações de *E. coli*.

Figura 23 – Curva de calibração do biossensor Au/Cys/NHS/NPs/ConA em contato com soluções de *E. coli*.



O limite de detecção (LOD) é definido como a menor quantidade ou concentração do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, mas não necessariamente quantificado, dentro das condições experimentais estabelecidas. Já o limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade ou concentração do analito presente em uma amostra que pode ser determinada quantitativamente com precisão e exatidão aceitáveis (ANVISA, 2017). De acordo com os parâmetros de validação analítica da ANVISA (ANVISA, 2017), as equações para determinação de LOD e LQ são expressas a seguir:

$$LOD = \frac{3,3\sigma}{IC} \quad (5)$$

$$LQ = \frac{10\sigma}{IC} \quad (6)$$

Onde σ é o desvio padrão do intercepto com o eixo y de três curvas de calibração construídas e IC é a inclinação da curva de calibração. A equação de regressão linear obtida pode ser expressa como $\Delta R_{CT} [\%] = 5,079 \log([E. coli] + 19,536)$, com o coeficiente de correlação de $R^2 = 0,982$, o que indica um bom desempenho do biossensor. O valor de LOD calculado foi de $0,2 \times 10^{-3}$ UFC/mL (equivalente a 1 UFC em 5000 mL de PBS) e o de LQ foi de $1,4 \times 10^1$ UFC/mL para a faixa linear de $1,7 \times 10^1$ a $8,3 \times 10^4$ UFC/mL. A Tabela 4 apresenta uma comparação do desempenho analítico do biossensor que foi desenvolvido com outros biossensores reportados na literatura, incluindo biossensores para detecção de patógenos em alimentos e água.

Dentre os trabalhos buscados na literatura, foi observado que a maioria dos estudos costumam relatar valores de LOD e faixa linear (que pode variar de 1 até 10^8 UFC/mL), não apresentando o LQ que, também, deve ser incluído para permitir melhor comparação entre os estudos podendo-se avaliar os parâmetros de validação, tais como precisão, exatidão, repetibilidade e seletividade (KAYA et al., 2021). Além disso, o tempo de resposta desses biossensores eletroquímicos tendem a variar de 20 min a 3 h. Apenas Lopez-Tellez e colaboradores (LOPEZ-TELLEZ et al., 2020) reportaram um valor de LQ ($1,5 \times 10^1$ UFC/mL) para um biossensor impedimétrico baseado em eletrodos de ouro modificados com ácido 16-mercaptohexadecanóico e lectina HA para detecção de *Salmonella spp.*, uma

bactéria gram-negativa, estando próximo ao calculado neste trabalho ($1,4 \times 10^1$ UFC/mL) para a bactéria *E. coli*.

Tabela 4 – Comparação entre biossensores eletroquímicos/impedimétricos para detecção de patógenos.

Patógeno alvo	Bioreceptor	Método eletroquímico	LOD	Referência
<i>E. coli</i>	Anti- <i>E. coli</i> policlonal	EIS	10 UFC/mL	(MAALOUF et al., 2007)
<i>Salmonella spp.</i>	Lectina HA	EIS	5 UFC/mL	(LOPEZ-TELLEZ et al., 2020)
<i>S. typhimurium</i>	Aptâmero anti- <i>S. typhimurium</i>	Potenciometria	0,2 UFC/mL	(ZELADA-GUILLEN et al., 2009)
<i>E. coli</i>	Lectina ConA e lectina RCA	VC e EIS	100 UFC/mL	(XI et al., 2011)
<i>E. coli</i>	Anti- <i>E. coli</i> policlonal	EIS	2 UFC/mL	(BARREIROS DOS SANTOS et al., 2013)
<i>E. coli</i>	Ligantes modificados com manose	VC	1 UFC/mL	(YAZGAN et al., 2014)
<i>S. aureus</i>	Anti- <i>S. aureus</i>	EIS	1,3 UFC/mL	(PRIMICERI et al., 2016)
<i>E. coli</i>	Lectina ConA	EIS	75 células/mL	(YANG et al., 2016)
<i>E. coli</i>	Lectina ConA	EIS	6×10^3 UFC/mL	(SAUCEDO; SRINIVES; MULCHANDANI, 2019)
<i>S. typhimurium</i>	Anti- <i>S. Typhimurium</i> policlonal	Amperometria	0,1 UFC/mL	(LIÉBANA et al., 2009)
<i>BRS</i>	Lectina ConA	EIS	1,8 UFC/mL	(WAN; ZHANG; HOU, 2009)
<i>E. coli</i>	Lectina ConA	Capacitivo	12 UFC/mL	(JANTRA et al., 2011)
<i>E. coli</i>	Lectina ConA	EIS	$0,2 \times 10^{-3}$ UFC/mL	Este trabalho

Abreviações: espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS), voltametria cíclica (VC), bactérias redutoras de sulfato (BRS), unidade formadora de colônia (UFC).

O biossensor Au/Cys/NHS/NPs/ConA, além de apresentar uma resposta de detecção rápida (15 min), foi capaz de detectar bactérias *E. coli* em uma baixa concentração, apresentando valor de LOD ($0,2 \times 10^{-3}$ UFC/mL) muito inferior aos reportados na literatura (vide Tabela 4). Poucos trabalhos relatam a detecção em baixas concentrações, podendo-se citar Carrillo-Gómez e colaboradores com detecção até $0,1 \times 10^{-1}$ UFC/mL de *E. coli* em amostra de água (CARRILLO-GÓMEZ; DURÁN-ACEVEDO; GARCÍA-RICO, 2019), e Gustavo e colaboradores que detecta até 0,2 UFC/mL de *Salmonella typhimurium* em solução de PBS (ZELADA-GUILLEN et al., 2009). O baixo limite de detecção que foi obtido apresenta vantagens quando comparado com outros biossensores baseados em antígenos específicos. A amplificação dos sinais de detecção e, portanto, o baixo valor de LOD calculado para o sistema estudado é atribuído à combinação das propriedades nanométricas das NPs de $\text{CoFe}_2\text{O}_4@NH_2$ (condutividade elétrica e a elevada área superficial) com a afinidade da lectina ConA por lipopolissacarídeos presentes nas paredes celulares da bactéria *E. Coli*. O método desenvolvido neste estudo é uma abordagem promissora e pode ser estendido no desenvolvimento de biossensores eletroquímicos para detecção altamente sensível de outras bactérias gram-negativas.

5 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste trabalho mostraram a formação efetiva de um biossensor impedimétrico rápido e sensível baseado em lectina para detecção da bactéria gram-negativa *Escherichia coli* (*E. coli*). O sensor foi desenvolvido através da formação de monocamadas sobre eletrodo de Au, incorporando nanopartículas (NPs) para amplificação do sinal e acoplamento com a lectina concanavalin A (ConA), usada como molécula de reconhecimento. Na etapa inicial, foi realizada a síntese das NPs de CoFe_2O_4 e seu recobrimento com 3-aminopropiltrietoxisilano (APTES), $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{NH}_2$. Os resultados de difração de raios X (DRX) mostraram a presença de picos característicos da fase de ferrita de cobalto indicando esta espécie como único produto da reação enquanto as imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET) mostraram a formação de partículas aproximadamente esféricas com tamanho médio de $7,3 \pm 0,8$ nm. As medidas de espalhamento dinâmico de luz (DLS) indicaram um aumento do diâmetro hidrodinâmico de 11,7 para 37,8 nm após adição de APTES apontando para a presença desta espécie na superfície das NPs. Os espectros vibracionais na região do infravermelho (IV) reforçaram essa atribuição visto que, após o revestimento com APTES, foram observadas bandas referentes aos modos vibracionais de estiramento das ligações Si—O—Si. A construção do biossensor se deu em etapas sequenciais iniciando com a formação de uma monocamada de cisteína (Cys) sobre ouro (Au/Cys). As moléculas de cisteína adsorvidas foram ativadas com N-hidroxisulfosuccinimida (NHS) e N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida hidrocloreto (EDC) formando a superfície Au/Cys/NHS que, por sua vez, foi imersa em suspensão aquosa de NPs de $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{NH}_2$ produzindo o eletrodo Au/Cys/NPs. Na etapa seguinte, esse eletrodo foi imerso em solução tampão PBS contendo ConA formando o biossensor Au/Cys/NPs/ConA. As medidas de voltametria cíclica (VC) em solução contendo os íons complexos $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ não apresentaram alterações significativas de corrente e potencial para os eletrodos de ouro não modificado e modificado até a etapa de imobilização das NPs de $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{NH}_2$ (Au/Cys/NPs). Após a modificação com ConA e imobilização das bactérias, todavia, foi observado uma diminuição nas correntes de pico associada ao efeito de bloqueio em relação à reação heterogênea de transferência de elétrons das espécies redox em solução. Os experimentos de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) forneceram parâmetros impedimétricos após cada etapa de modificação do eletrodo. Valores progressivamente mais elevados de resistência de transferência de carga (R_{CT}), taxa de

recobrimento superficial (θ) e diminuição da constante de velocidade aparente (k_{app}) foram observados a cada etapa de modificação. Os valores de R_{CT} obtidos a partir dos diagramas de Nyquist aumentaram em cada etapa variando de 50,43 para 532,56 $\Omega \text{ cm}^2$ para as superfícies Au/Cys/NPs e Au/Cys/NPs/ConA, respectivamente, mostrando o bloqueio da superfície em relação às espécies redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ após imobilização da lectina. O efeito de bloqueio foi observado de forma ainda mais intensa após imersão de 15 min em solução contendo a bactéria *E. coli*, sendo os limites superiores ($R_{CT} = 2239,25 \Omega \text{ cm}^2$, $\theta = 0,987$ e $k_{app} = 0,47 \times 10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$) atingidos após imersão em solução $8,3 \times 10^4 \text{ UFC/mL}$ de *E. coli*. O desempenho do biosensor para detecção da bactéria *E. coli* foi avaliado através da variação relativa de R_{CT} ($\Delta R_{CT} \%$) em função da concentração do analito. Os valores de limite de detecção (LOD) e quantificação (LQ) obtidos a partir dessa curva foram de $0,2 \times 10^{-3}$ e $1,4 \times 10^1 \text{ UFC/mL}$, respectivamente. O baixo valor de LOD foi atribuído à combinação das propriedades nanométricas das NPs de $\text{CoFe}_2\text{O}_4@ \text{NH}_2$ (condutividade elétrica e a elevada área superficial) com a afinidade da lectina ConA por lipopolissacarídeos presentes nas paredes celulares da bactéria *E. Coli*. Comparativamente a sistemas reportados na literatura para bactérias gram-negativas, o valor de LOD determinado neste trabalho indica a produção de um biossensor impedimétrico rápido (apenas 15 min de contato) e de baixos limite de detecção e custo para detecção de *E. coli*.

REFERÊNCIAS

- ANVISA. Resolução da diretoria colegiada - RDC n° 166, de 24 de Julho de 2017. **Ministério da Saúde**, p. 1–21, 2017.
- ARKLES, B.; JR, W. R. P.; ANDERSON, R. **Silicon compounds: register and review**. 3d edition, Biristol, PA: Petrarch Systems Inc, 1984.
- BALAKRISHNAN, B. *et al.* A rapid and highly specific immunofluorescence method to detect Escherichia coli O157:H7 in infected meat samples. **International Journal of Food Microbiology**, v. 231, p. 54–62, 2016.
- BANERJEE, T. *et al.* Multiparametric magneto-fluorescent nanosensors for the ultrasensitive detection of Escherichia coli O157:H7. **ACS Infectious Diseases**, v. 2, n. 10, p. 667–673, 2016.
- BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications**. 2. ed, v. 2, New York: John Wiley & Sons, Inc, 2001.
- BARREIROS DOS SANTOS, M. *et al.* Highly sensitive detection of pathogen Escherichia coli O157:H7 by electrochemical impedance spectroscopy. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 45, p. 174–180, 2013.
- BANDYOPADHYAY, K. *et al.* Impedance analysis of self-assembled naphthalene disulfide monolayer on gold using external redox probes. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 447, p. 11–16, 1998.
- BASTIANELLO, M.; GROSS, S.; ELM, M. T. Thermal stability, electrochemical and structural characterization of hydrothermally synthesised cobalt ferrite (CoFe₂O₄). **RSC Advances**, v. 9, n. 57, p. 33282–33289, 2019.
- BLOEMEN, M. *et al.* Improved functionalization of oleic acid-coated iron oxide nanoparticles for biomedical applications. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 14, n. 9, p. 1–10, 2012.
- BREED, R. S.; DOTERRER, W. D. The number of colonies allowable on satisfactory agar plates. **Journal of Bacteriology**, v. 1, n. 3, p. 321–331, maio 1916.
- BREITENBACH BARROSO COELHO, L. C. *et al.* Lectins as antimicrobial agents. **Journal of Applied Microbiology**, v. 125, n. 5, p. 1238–1252, 2018.

BRUCKENSTEIN, S.; SHAY, M. An in situ weighing study of the mechanism for the formation of the adsorbed oxygen monolayer at a gold electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 188, n. 1–2, p. 131–136, 1985.

CANNAS, C. *et al.* CoFe₂O₄ and CoFe₂O₄/SiO₂ core/shell nanoparticles: magnetic and spectroscopic study. **Chemistry of Materials**, v. 22, n. 11, p. 3353–3361, 2010.

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

CARRILLO-GÓMEZ, J.; DURÁN-ACEVEDO, C.; GARCÍA-RICO, R. Concentration detection of the E. coli bacteria in drinking water treatment plants through an e-nose. **Water**, v. 11, n. 774, p. 1–15, 2019.

CARRILLO, J.; DURÁN, C. Fast identification of bacteria for quality control of drinking water through a static headspace sampler coupled to a sensory perception system. **Biosensors**, v. 9, n. 1, p. 23, 2019.

CASTILLO-HENRÍQUEZ, L. *et al.* Biosensors for the detection of bacterial and viral clinical pathogens. **Sensors**, v. 20, n. 23, p. 6926, 2020.

CASTLE, L. M. *et al.* Electrochemical sensors to detect bacterial foodborne pathogens. **ACS Sensors**, v. 6, n. 5, p. 1717–1730, 2021.

CEA, P. *et al.* Nanofabrication and electrochemical characterization of self-assembled monolayers sandwiched between metal nanoparticles and electrode surfaces. **Journal of Chemical Education**, v. 93, p. 1441–1445, 2016.

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

CHEN, R. *et al.* A novel fluorescence immunoassay for the sensitive detection of Escherichia coli O157:H7 in milk based on catalase-mediated fluorescence quenching of CdTe quantum dots. **Analytica Chimica Acta**, v. 947, p. 50–57, 2016.

CHEN, Y.-T. *et al.* Biosensing Using Magnetic Particle Detection Techniques. **Sensors**, v. 17, n. 10, p. 2300, 2017.

CHU, Z.; PENG, J.; JIN, W. Advanced nanomaterial inks for screen-printed chemical sensors. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 243, p. 919–926, 2017.

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

COLLIGNON, P. *et al.* Anthropological and socioeconomic factors contributing to global antimicrobial resistance: a univariate and multivariable analysis. **The Lancet Planetary Health**, v. 2, n. 9, p. e398–e405, 2018.

CUI, B.; LIANG, S. Monitoring opportunistic pathogens in domestic wastewater from a pilot-scale anaerobic biofilm reactor to reuse in agricultural irrigation. **Water**, v. 11, n. 6, 2019.

CULLITY, B. D. **Elements of X-ray diffraction**. 2nd ed. London: Addison-Wesley, 1978.

DA SILVA, J. S. L. *et al.* Impedimetric sensor of bacterial toxins based on mixed (Concanavalin A)/polyaniline films. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 117, p. 549–554, 2014.

DE PALMA, R. *et al.* Silane ligand exchange to make hydrophobic superparamagnetic nanoparticles water-dispersible. **Chemistry of Materials**, v. 19, n. 7, p. 1821–1831, 2007.

DUTTA, A. *et al.* Multifunctional GQDs-Concanavalin A@Fe₃O₄ nanocomposites for cancer cells detection and targeted drug delivery. **Analytica Chimica Acta**, v. 1027, p. 109–120, 2018.

ELGRISHI, N. *et al.* A practical beginner's guide to cyclic voltammetry. **Journal of Chemical Education**, v. 95, n. 2, p. 197–206, 2018.

ETCHEVERRÍA, A. I.; PADOLA, N. L. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in human, cattle, and foods. Strategies for detection and control. **Virulence**, v. 4, n. 5, p. 366–372, 2013.

FURST, A. L.; FRANCIS, M. B. Impedance-based detection of bacteria. **Chemical Reviews**, v. 119, n. 1, p. 700–726, 2019.

GAWANDE, M. B. *et al.* Silica-decorated magnetic nanocomposites for catalytic applications. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 288, p. 118–143, 2015.

GORBACHEV, E. A. *et al.* Design of modern magnetic materials with giant coercivity. **Russian Chemical Reviews**, v. 90, n. 10, p. 1287–1329, 2021.

GUAN, J. G.; MIAO, Y. Q.; ZHANG, Q. J. Impedimetric biosensors. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 97, n. 4, p. 219–226, 2004.

HAMELIN, A. Behaviour of Au (100) in perchloric and sulphuric acid solutions. **Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry**, v. 255, p. 281–289, 1988.

HEYMANN, F. *et al.* The concanavalin A model of acute hepatitis in mice. **Laboratory Animals**, v. 49, p. 12–20, 2015.

H. SAISHO; Y. GOHSHI. **Applications of Synchrotron Radiation to Materials Analysis**. 1. ed, v. 7, Elsevier Science, 1996.

JANTRA, J. *et al.* Real-time label-free affinity biosensors for enumeration of total bacteria based on immobilized concanavalin A. **Journal of Environmental Science and Health, Part A**, v. 46, n. 13, p. 1450–1460, 2011.

JETT, B. D. *et al.* Simplified agar plate method for quantifying viable bacteria. **BioTechniques**, v. 23, n. 4, p. 648–650, out. 1997.

KADADOU, D. *et al.* Recent advances in the biosensors application for the detection of bacteria and viruses in wastewater. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 10, n. 1, p. 107070, 2022.

KAYA, H. O. *et al.* Pathogen detection with electrochemical biosensors: Advantages, challenges and future perspectives. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 882, 2021.

KAZEMI, M.; GHOBADI, M.; MIRZAIE, A. Cobalt ferrite nanoparticles (CoFe₂O₄ MNPs) as catalyst and support: Magnetically recoverable nanocatalysts in organic synthesis. **Nanotechnology Reviews**, v. 7, n. 1, p. 43–68, 2018.

KEARNS, H. *et al.* Sens detection of multiple antimicrobial-resistant pathogens using nanosensors. **Analytical Chemistry**, v. 89, n. 23, p. 12666–12673, 2017.

KOKKINOS, C.; ECONOMOU, A.; PRODRMIDIS, M. I. Electrochemical immunosensors: Critical survey of different architectures and transduction strategies. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 79, p. 88–105, 2016.

KOSSOY, A. *et al.* Optical and structural properties of ultra-thin gold films. **Advanced Optical Materials**, v. 3, n. 1, p. 71–77, jan. 2015.

KOTSIRI, Z. *et al.* Sensitive detection of E. coli in artificial seawater by aptamer-coated magnetic beads and direct pcr. **Applied Sciences**, v. 9, n. 24, p. 5392, 2019.

KOTSIRI, Z.; VIDIC, J.; VANTARAKIS, A. Applications of biosensors for bacteria and virus detection in food and water – a systematic review. **Journal of Environmental Sciences**, v. 111, p. 367–379, 2022.

LASIA, A. **Electrochemical Impedance Spectroscopy and its Applications**, New York, Springer, 2014.

LEVA-BUENO, J.; PEYMAN, S. A.; MILLNER, P. A. A review on impedimetric immunosensors for pathogen and biomarker detection. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 209, n. 3, p. 343–362, 2020.

LI, Y. S. *et al.* Preparation and characterization of silica coated iron oxide magnetic nanoparticles. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 76, n. 5, p. 484–489, 2010.

LIM, J. *et al.* Characterization of magnetic nanoparticle by dynamic light scattering. **Nanoscale Research Letters**, v. 8, n. 1, p. 1–14, 2013.

LIMAYE, M. V. *et al.* Magnetic studies of SiO₂ coated CoFe₂O₄ nanoparticles. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 441, p. 683–690, 2017.

LIU, F. *et al.* Synthesis, characterization, and application of Fe₃O₄@SiO₂-NH₂ nanoparticles. **RSC Advances**, v. 5, n. 23, p. 18128–18136, 2015.

LIÉBANA, S. *et al.* Rapid detection of Salmonella in milk by electrochemical magneto-immunosensing. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 25, n. 2, p. 510–513, 2009.

LIEN, Y. H.; WU, T. M. Preparation and characterization of thermosensitive polymers grafted onto silica-coated iron oxide nanoparticles. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 326, n. 2, p. 517–521, 2008.

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

LOVE, J. C. *et al.* Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. **Chemical Reviews**, v. 105, n. 4, p. 1103–1169, 2005.

LU, A. H.; SALABAS, E. L.; SCHÜTH, F. Magnetic nanoparticles: Synthesis, protection, functionalization, and application. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 46, n. 8, p. 1222–1244, 2007.

LU, L. T. *et al.* Synthesis of magnetic cobalt ferrite nanoparticles with controlled morphology, monodispersity and composition: The influence of solvent, surfactant, reductant and synthetic conditions. **Nanoscale**, v. 7, n. 46, p. 19596–19610, 2015.

LVOVICH, V. F. **Impedance Spectroscopy: Applications to Electrochemical and Dielectric Phenomena**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2012.

- MAALOUF, R. *et al.* Label-free detection of bacteria by electrochemical impedance spectroscopy: comparison to surface plasmon resonance. **Analytical Chemistry**, v. 79, n. 13, p. 4879–4886, 2007.
- MAJDINASAB, M.; HAYAT, A.; MARTY, J. L. Aptamer-based assays and aptasensors for detection of pathogenic bacteria in food samples. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 107, p. 60–77, 2018.
- MALHOTRA, B. D.; ALI, M. A. Nanomaterials in Biosensors: Fundamentals and Applications. **Nanomaterials for Biosensors**. 1. ed, Elsevier, p. 1–74, 2018.
- MALVANO, F.; PILLOTON, R.; ALBANESE, D. Sensitive detection of Escherichia coli O157:H7 in food products by impedimetric immunosensors. **Sensors**, v. 18, n. 7, p. 1–11, 2018.
- MALVANO, F.; PILLOTON, R.; ALBANESE, D. A novel impedimetric biosensor based on the antimicrobial activity of the peptide nisin for the detection of Salmonella spp. **Food Chemistry**, v. 325, p. 126868, 2020.
- MAO, K. *et al.* Biosensors for wastewater-based epidemiology for monitoring public health. **Water Research**, v. 191, 2021.
- MCAFEE, L. Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds. Part A: Theory and Applications in Inorganic Chemistry; Part B: Application in Coordination, Organometallic, and Bioinorganic Chemistry. **Journal of Chemical Education**, v. 77, n. 9, p. 1122, 1 set. 2000.
- MENDES, R. K. *et al.* Characterization of self-assembled thiols monolayers on gold surface by electrochemical impedance spectroscopy. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 15, n. 6, p. 849–855, 2004.
- MENON, S.; KUMAR, K. G. Simultaneous voltammetric determination of acetaminophen and its fatal counterpart nimesulide by gold nano/L-cysteine modified gold electrode. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 164, n. 9, p. 482–487, 2017.
- MERA, R. M. *et al.* Increasing role of Staphylococcus aureus and community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections in the united states: a 10-year trend of replacement and expansion. **Microbial Drug Resistance**, v. 17, n. 2, p. 321–328, 2011.
- MI, F. *et al.* Application of lectin-based biosensor technology in the detection of foodborne pathogenic bacteria: A review. **Analyst**, v. 146, n. 2, p. 429–443, 2021.
- MICHAEL GREEN, N. Avidin and streptavidin. **Methods in Enzymology**, v. 184, p. 51–67, 1990.

MOKHTARZADEH, A. *et al.* Nanomaterial-based biosensors for detection of pathogenic virus. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 97, p. 445–457, 2017.

MUDALIGE, T. *et al.* Characterization of nanomaterials: tools and challenges. **Nanomaterials for Food Applications**. Elsevier, p. 313–353, 2019.

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

ODONKOR, S. T.; AMPOFO, J. K. Escherichia coli as an indicator of bacteriological quality of water: an overview. **Microbiology Research**, v. 4, n. 1, p. 2, 2013.

ÖZCAN, B. *et al.* Introducing a new method for evaluation of the interaction between an antigen and an antibody: Single frequency impedance analysis for biosensing systems. **Talanta**, v. 125, p. 7–13, 2014.

PAPADAKIS, G. *et al.* Micro-nano-bio acoustic system for the detection of foodborne pathogens in real samples. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 111, n. March, p. 52–58, 2018.

PAULO, T. DE F.; DIÓGENES, I. C. N.; ABRUÑA, H. D. Direct Electrochemistry and Electrocatalysis of Myoglobin Immobilized on L-Cysteine Self-Assembled Gold Electrode. **Langmuir**, v. 27, n. 5, p. 2052–2057, 2011.

POIRIER, G. E.; PYLANT, E. D. The self-assembly mechanism of alkanethiols on Au (111). **Science**, v. 272, n. 5265, p. 1145–1148, 1996.

PRIMICERI, E. *et al.* A multipurpose biochip for food pathogen detection. **Analytical Methods**, v. 8, n. 15, p. 3055–3060, 2016.

PURNAMA, B. *et al.* Dependence of structural and magnetic properties on annealing times in co-precipitated cobalt ferrite nanoparticles. **Journal of Magnetism**, v. 20, n. 3, p. 207–210, 2015.

RAMANUJAM, A. *et al.* Rapid electrochemical detection of Escherichia coli using nickel oxidation reaction on a rotating disk electrode. **Chemical Engineering Journal**, v. 411, p. 128453, 2021.

RAMAY, B. M. *et al.* Antibiotic use and hygiene interact to influence the distribution of antimicrobial-resistant bacteria in low-income communities in Guatemala. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 13767, 2020.

RANDVIIR, E. P.; BANKS, C. E. Electrochemical impedance spectroscopy: An overview of bioanalytical applications. **Analytical Methods**, v. 5, n. 5, p. 1098–1115, 2013.

RAVAL, N. *et al.* Importance of physicochemical characterization of nanoparticles in pharmaceutical product development. **Basic Fundamentals of Drug Delivery**. Academic Press, v. 1p. 369–400, 2019.

RAZMI, N. *et al.* Recent progress on the electrochemical biosensing of Escherichia coli O157:H7: Material and methods overview. **Biosensors**, v. 10, n. 5, p. 1–18, 2020.

REINA, J. J. *et al.* Docking, synthesis, and NMR studies of mannosyl trisaccharide ligands for DC-SIGN lectin. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 6, n. 15, p. 2743–2754, 2008.

RENGARAJ, S. *et al.* Impedimetric paper-based biosensor for the detection of bacterial contamination in water. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 265, p. 50–58, 2018.

RIU, J.; GIUSSANI, B. Electrochemical biosensors for the detection of pathogenic bacteria in food. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 126, p. 115863, 2020.

ROCK, P. A. The Standard Oxidation Potential of the Ferrocyanide-Ferricyanide Electrode 25° and the Entropy of Ferrocyanide Ion. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 70, n. 2, p. 576–580, 1966.

RUSHWORTH, J. V. *et al.* **Impedimetric Biosensors for Medical Applications: Current Progress and Challenges**. 1. ed. New York: ASME Press, 2013.

RUSHWORTH, J. V. *et al.* A label-free electrical impedimetric biosensor for the specific detection of Alzheimer's amyloid-beta oligomers. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 56, p. 83–90, 2014.

SAUCEDO, N. M.; SRINIVES, S.; MULCHANDANI, A. Electrochemical biosensor for rapid detection of viable bacteria and antibiotic screening. **Journal of Analysis and Testing**, v. 3, n. 1, p. 117–122, 2019.

SHAANAN, B.; LIS, H.; SHARON, N. Structure of a legume lectin with an ordered n-linked carbohydrate in complex with lactose. **Science**, v. 254, n. 5033, p. 862–866, 1991.

SHAHJUEE, T.; MORTEZA MASOUDPANAH, S.; MOHAMMAD MIRKAZEMI, S. Coprecipitation synthesis of CoFe₂O₄ nanoparticles for hyperthermia. **Journal of Ultrafine Grained and Nanostructured Materials**, v. 50, n. 2, p. 105–110, 2017.

SHEN, Z. *et al.* Nonlabeled quartz crystal microbalance biosensor for bacterial detection using carbohydrate and lectin recognitions. **Analytical Chemistry**, v. 79, n. 6, p. 2312–2319, 2007.

SHIN, H. S.; LEE, J. H.; KNOW, S. J. A study on the s-block structure in hexagonal ferrites. **Journal of the Korean Ceramic Society**, v. 31, n. 1, p. 62–68, 1994.

SHOHOJI, N. **Statistical Thermodynamic Approach to Interstitial Non-stoichiometric Compounds** (Hydride, Carbide, Nitride, Phosphide and Sulphide). LAP - Lambert Academic Publishing, p. 114, 2013.

SHUKLA, N. *et al.* FTIR study of surfactant bonding to FePt nanoparticles. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 266, n. 1–2, p. 178–184, 2003.

SILVA, M. A. S. **Nanopartículas magnéticas de FeCo@Au: preparação, caracterização e funcionalização com complexo de Ru(II) luminescente**. 2014. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São Paulo, Araraquara, 2014.

SIMÃO, E. P. *et al.* Nanostructured impedimetric lectin-based biosensor for arboviruses detection. **Talanta**, v. 208, p. 120338, 2020.

SMIT, J.; WIJN, H. P. J. **Ferrites**. Eindhoven: Philips Technical Library, 1959.

S. TRASATTI AND O. A. PETRII. Real surface area measurements in electrochemistry. **Pure and Applied Chemistry**, v. 63, n. 5, p. 711–734, 1991.

SUTTON SCOTT. Accuracy of Plate Counts. **Journal of validation technology**, v. 17, n. 3, p. 42–46, 2011.

SWATSITANG, E. *et al.* Characterization and magnetic properties of cobalt ferrite nanoparticles. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 664, p. 792–797, 2016.

TARDITTO, L. V. *et al.* Electrochemical sensor for the determination of enterotoxigenic *Escherichia coli* in swine feces using glassy carbon electrodes modified with multi-walled carbon nanotubes. **Microchemical Journal**, v. 127, p. 220–225, 2016.

TEMPLIER, V. *et al.* Ligands for label-free detection of whole bacteria on biosensors: A review. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 79, p. 71–79, 2016.

THERMO FISHER SCIENTIFIC, **Carbodiimide Crosslinker Chemistry**. Fortaleza, 2022. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/carbodiimide-crosslinker-chemistry.html#1>. Acesso em: 9 mar. 2022.

THÉVENOT, D. R. *et al.* Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. **Pure Appl. Chem.**, v. 71, n. 12, p. 2333–2348, 1999.

UNAL, N. WHO sepsis technical expert meeting. Geneva: **World Health Organization**, 2018.

ULMAN, A. Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers. **Chemical Reviews**, v. 96, n. 4, p. 1533–1554, 1996.

VARSHNEY, M. *et al.* A label-free, microfluidics and interdigitated array microelectrode-based impedance biosensor in combination with nanoparticles immunoseparation for detection of *Escherichia coli* O157:H7 in food samples. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 128, n. 1, p. 99–107, 2007.

VELUSAMY, V. *et al.* An overview of foodborne pathogen detection: In the perspective of biosensors. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 2, p. 232–254, 2010.

VOGT, S. *et al.* Critical view on electrochemical impedance spectroscopy using the ferri/ferrocyanide redox couple at gold electrodes. **Analytical Chemistry**, v. 88, p. 4383–4390, 2016.

WALDRON, R. D. Infrared spectra of ferrites. **Physical Review**, v. 99, n. 6, p. 1727–1735, 1955.

WAN, Y.; ZHANG, D.; HOU, B. Monitoring microbial populations of sulfate-reducing bacteria using an impedimetric immunosensor based on agglutination assay. **Talanta**, v. 80, n. 1, p. 218–223, 2009.

WANG, R. *et al.* A label-free impedance immunosensor using screen-printed interdigitated electrodes and magnetic nanobeads for the detection of *E. coli* O157:H7. **Biosensors**, v. 5, n. 4, p. 791–803, 2015.

WANG, Y.; RAVINDRANATH, S.; IRUDAYARAJ, J. Separation and detection of multiple pathogens in a food matrix by magnetic SERS nanoprobe. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 399, n. 3, p. 1271–1278, 2011.

WANG, Y.; YE, Z.; YING, Y. New trends in impedimetric biosensors for the detection of foodborne pathogenic bacteria. **Sensors**, v. 12, n. 3, p. 3449–3471, 2012.

WU, W.; HE, Q.; JIANG, C. Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis and surface functionalization strategies. **Nanoscale Research Letters**, v. 3, n. 11, p. 397–415, 2008.

XI, F. *et al.* Discrimination and detection of bacteria with a label-free impedimetric biosensor based on self-assembled lectin monolayer. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 656, n. 1–2, p. 252–257, 2011.

XU, L.; BAI, X.; BHUNIA, A. K. Current state of development of biosensors and their application in foodborne pathogen detection. **Journal of Food Protection**, v. 84, n. 7, p. 1213–1227, 2021.

XU, R. Progress in nanoparticles characterization: Sizing and zeta potential measurement. **Particuology**, v. 6, n. 2, p. 112–115, 2008.

YAMAURA, M. *et al.* Preparation and characterization of (3-aminopropyl)triethoxysilane-coated magnetite nanoparticles. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 279, n. 2–3, p. 210–217, 2004.

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

YAZGAN, I. *et al.* Biosensor for selective detection of E. coli in spinach using the strong affinity of derivatized mannose with fimbrial lectin. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 61, p. 266–273, 2014.

YE, L.; ZHAO, G.; DOU, W. An electrochemical immunoassay for Escherichia coli O157:H7 using double functionalized Au@Pt/SiO₂ nanocomposites and immune magnetic nanoparticles. **Talanta**, v. 182, p. 354–362, 2018.

YOO, E. H.; LEE, S. Y. Glucose biosensors: An overview of use in clinical practice. **Sensors**, v. 10, n. 5, p. 4558–4576, 2010.

YOUNG, R. A. Introduction to the Rietveld method, **The Rietveld Method**, edited by R. A. Young (Oxford University Press, Oxford), pp.1–38, 1993.

ZELADA-GUILLEN, G. A. *et al.* Immediate detection of living bacteria at ultralow concentrations using a carbon nanotube based potentiometric aptasensor. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 48, n. 40, p. 7334–7337, 2009.

ZHANG, J. M. *et al.* Crucial factors affecting the physicochemical properties of sol-gel produced Fe₃O₄@SiO₂-NH₂ core-shell nanomaterials. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v. 64, n. 2, p. 347–357, 2012.

ZHANG, L.; HE, R.; GU, H. C. Oleic acid coating on the monodisperse magnetite nanoparticles. **Applied Surface Science**, v. 253, n. 5, p. 2611–2617, 2006.

ZIRAK, M. *et al.* Carboxymethyl cellulose coated Fe₃O₄@SiO₂ core-shell magnetic nanoparticles for methylene blue removal: equilibrium, kinetic, and thermodynamic studies. **Cellulose**, v. 25, n. 1, p. 503–515, 2018.

ANEXO A - IMAGENS DE MET DAS NPS EM MAIOR ESCALA

Figura – Imagens de MET das NPs CoFe_2O_4 (A) e $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{NH}_2$ (B).

