



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE
UBERLÂNDIA INSTITUTO DE
BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E
BIOQUÍMICA**

**DESENVOLVIMENTO DE GENOSENSORES ELETROQUÍMICOS PARA
FUNGOS PATOGÊNICOS: *Candida auris* E *Trichophyton rubrum***

Aluno: Pedro Henrique Gonçalves Guedes

Orientador: Prof^a. Dr^a. Ana Graci Brito Madurro

Co-orientador: Prof. Dr. João Marcos Madurro

Uberlândia – MG

2023



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE
UBERLÂNDIA INSTITUTO DE
BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E
BIOQUÍMICA**

**DESENVOLVIMENTO DE GENOSENSORES ELETROQUÍMICOS PARA
FUNGOS PATOGÊNICOS: *Candida auris* E *Trichophyton rubrum***

Aluno: Pedro Henrique Gonçalves Guedes

Orientador: Prof^a. Dr^a. Ana Graci Brito Madurro

Co-orientador: Prof. Dr. João Marcos Madurro

**Tese apresentada à Universidade Federal de
Uberlândia como parte dos requisitos para
obtenção do Título de Doutor em Genética e
Bioquímica (Área: Bioquímica)**

Uberlândia – MG

2023

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

G924 2023	Guedes, Pedro Henrique Gonçalves, 1994- Desenvolvimento de genossensores eletroquímicos para fungos patogênicos: <i>Candida auris</i> e <i>Trichophyton rubrum</i> [recurso eletrônico] : Biossensores eletroquímicos para a detecção de <i>Candida auris</i> e <i>Trichophyton rubrum</i> / Pedro Henrique Gonçalves Guedes. - 2023. Orientadora: Ana Graci Britto Madurro. Coorientadora: João Marcos Madurro. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Genética e Bioquímica. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.te.2023.412 Inclui bibliografia. Inclui ilustrações. 1. Genética. I. Madurro, Ana Graci Britto, 1967-, (Orient.). II. Madurro, João Marcos, 1961-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Genética e Bioquímica. IV. Título. CDU: 575
--------------	--

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica
 Av. Pará 1720, Bloco 2E, Sala 244 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
 Telefone: +55 (34) 3225-8438 - www.ppggb.ibtec.ufu.br - ppggb@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Genética e Bioquímica				
Defesa de:	Doutorado Acadêmico				
Data:	Primeiro de setembro de dois mil e vinte e três	Hora de início:	14:00h	Hora de encerramento:	17:30h
Matrícula do Discente:	11923GBI013				
Nome do Discente:	Pedro Henrique Gonçalves Guedes				
Título do Trabalho:	Desenvolvimento de genossensores eletroquímicos para fungos patogênicos: <i>Candida auris</i> e <i>Trichophyton rubrum</i>				
Área de concentração:	Bioquímica				
Linha de pesquisa:	Nanobiotecnologia				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Desenvolvimento de produtos e processos baseados em nanobiotecnologia, sensores, materiais nanoestruturados e nanomagnéticos.				

Ao primeiro dia do mês de setembro de dois mil e vinte e três, às 14:00 horas, reuniu-se via web conferência pela *Plataforma Microsoft Teams*, em conformidade com a Portaria nº 36, de 19 de março de 2020 da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, Resolução de nº06/2020 e Resolução nº 19/2022 do Conselho de Pesquisa e Pós-graduação pela Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica, assim composta: Dr^a. Ana Paula Mendes Silva, Dr^a. Eliana Cristina da Silva Rigo, Dr. Carlos Ueira Vieira, Dr^a. Renata Santos Rodrigues e Dr^a. Ana Graci Brito Madurro, orientadora do candidato e demais convidados presentes conforme lista de presença. Iniciando os trabalhos presidente da mesa, Dr^a. Ana Graci Brito Madurro apresentou a Comissão Examinadora e o candidato, agradeceu a presença do público, e concedeu o Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica. A seguir a senhora presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos examinadores, que passaram a arguir o candidato. Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais. Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou o candidato:

APROVADO.

Esta defesa de Tese de Doutorado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU. Nada mais havendo a tratar foram

encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Carlos Ueira Vieira, Professor(a) do Magistério Superior**, em 01/09/2023, às 17:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Renata Santos Rodrigues, Professor(a) do Magistério Superior**, em 01/09/2023, às 17:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ana Graci Brito Madurro, Professor(a) do Magistério Superior**, em 01/09/2023, às 17:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ana Paula Mendes Silva, Usuário Externo**, em 01/09/2023, às 17:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Eliana Cristina da Silva Rigo, Usuário Externo**, em 01/09/2023, às 17:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site

[https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0)

[acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **4684353** e o código CRC **E9249C71**.



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE
UBERLÂNDIA INSTITUTO DE
BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E
BIOQUÍMICA**

**DESENVOLVIMENTO DE GENOSENSORES ELETROQUÍMICOS PARA
FUNGOS PATOGÊNICOS: *Candida auris* E *Trichophyton rubrum***

Aluno: Pedro Henrique Gonçalves Guedes

Comissão Examinadora Presidente:

Prof^a. Dr^a. Ana Graci Brito Madurro (Orientadora)

Examinadores: Dr^a. Ana Paula Mendes-Silva

Prof^a. Dr^a. Eliana Cristina da Silva Rigo

Prof. Dr. Carlos Ueira Vieira

Prof^a. Dr^a. Renata Santos Rodrigues

Data da Defesa: 01/09/2023

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas do PGGB para o formato da tese foram contempladas

Prof^a. Dr^a. Ana Graci Brito Madurro

Dedico essa tese a minha mãe
Beatriz Gonçalves Mendes, minha força de viver

Agradecimentos

Agradeço a minha mamadi Beatriz Gonçalves Mendes, *in memoriam*, por ter sido uma mãe incrível e guerreira que sempre me incentivou a seguir os caminhos que me levaram até aqui. Obrigado por ter sido a melhor mãe e pai ao mesmo tempo desde que nasci e lutou para que nunca faltasse nada em nosso lar. Tudo que eu trabalhei até chegar aqui foi pela senhora, pois meu objetivo é e sempre será te honrar. Te amo. Além disso, agradeço a minha irmã Aliny Graciely Gonçalves Guedes de Castro, ao meu cunhado Luís de Castro Júnior e aos meus sobrinhos Luís Otávio Gonçalves de Castro e Maria Beatriz Gomes de Castro pelo amor e suporte incondicional.

Agradeço a Deus, Jesus Cristo e Oxalá por terem me guiado até aqui. Agradeço à entidade Baiana Maria do Côco, a qual salvou minha vida e a carregarei comigo por todos os anos que estão por vir. Além disso, agradeço às entidades: Maria Navalha; Rosa Caveira; Cigana Estrela; Sete Roseiras; Cigana Helena; Cangaceira Níbia e Ritinha da Lapa que tiveram o carinho e força para que eu possa erguer-me, guiar e proteger em momentos de desamparos e escuridão. Obrigado por iluminarem minha vida.

Agradeço a minha psiquiatra Eline Nicole Assad por me acolher e ajudar a ser sempre a melhor versão de mim mesmo. Eu te agradeço pelo sono que você me proporcionou quando todos os médicos não conseguiram.

Agradeço a minha amiga e parceira de vida, Dayane Dotto de Moraes, que ao longo de mais de uma década sempre esteve ao meu lado profissionalmente e pessoalmente. Agradeço a minha melhor amiga e companheira de trabalho Jéssica Guimarães Brussasco pela amizade, carinho, lealdade e empatia para comigo sempre. Te amo, meu amor. E para sempre Butantaners seguiremos os três juntos nessa vida.

Agradeço aos meus melhores amigos: Maria Clara Nogueira Jeremias, Maria Cecília Nogueira Jeremias, Nina Albassan e Luana Marques Pereira pelo suporte e ajuda ao longo anos. Além disso, agradeço aos meus companheiros de trabalho José Flauzino, Luiz Gabriel Luz, Mônica Segatto e Bárbara pela ajuda e acolhimento dentro e fora do ambiente de trabalho.

Agradeço a minha orientadora Prof^a Dra. Ana Graci Madurro por me receber de braços abertos no mestrado e doutorado. Obrigado por sempre acreditar no meu potencial como cientista e abraçar as minhas ideias e projetos. Eu te agradeço por, além de ter sido minha orientadora, ter sido uma mãe nos momentos mais difíceis e sombrios da minha vida. Obrigado por tudo que a senhora fez e faz por mim. Jamais esquecerei. Se eu me tornei o pesquisador que sou hoje, eu agradeço a senhora por ter sido a minha inspiração. Agradeço também a coorientação do Prof^o Dr. João Marcos Madurro.

Agradeço à Universidade Federal de Uberlândia e ao Instituto de Biotecnologia. Agradeço ao Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica, especialmente a Janaina por toda a competência e profissionalismo. Além disso, agradeço a todos os membros da banca por terem aceitado meu convite e contribuído com o meu trabalho. Ademais agradeço aos órgãos de fomento: CAPES, CNPQ, FAPEMIG.

Lista de abreviações

AFM: Atomic force microscopy (microscopia de força atômica)
Au: Eletrodo de ouro
4-AMF - 4-aminofenol
4-AP - 4-aminophenol
C. ALBICANS – *Candida Albicans*
C. auris - *Candida auris*
CDC - Centro de Controle E Prevenção De Doenças
C_{DL}: capacitância da dupla camada elétrica
COVID-19 - Doença Coronavírus
CRISPR - Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas
DFM - Dynamic Force Microscope
DNA - Ácido Desoxirribonucleico
DPV - differential potencial voltammetry
dsDNA - Stranded DNA viruses
E - Potencial elétrico
EIS - Electrochemical impedance spectroscopy
En - nail scraping enrichment
gDNA - Ácido Desoxirribonucleico Genômico
gRNA - Ácido Ribonucleico Genômico
HIV - Virus Da Imunodeficiência Humana
I - Corrente elétrica
IFD - Doenças Fúngicas Invasivas
ip – Corrente de pico
i_{pa} - Corrente de pico anódico
i_{pc} - Corrente de pico catódico
LOD - Limit of Detection
μA: Microampere
μL: Microlitro
μm: Micrômetro
μmol: Micromol
min: Minutos
nmol: nanomol

mmol: milimol

mV: milivolt

ng: nanograma

nm: nanômetro

ω : (ômega) frequência utilizada para impedância

Ω : ohm

OMS - Organização Mundial De Saúde

PBS - Phosphate Buffer Solution

PCR - Reação de Cadeia Polimerase

qPCR - Quantitative Real-Time PCR

Rct - Resistência à Transferência De Carga

RNA - Ácido Ribonucleico

Rs - Resistência da Solução

SEM - Scanning Electron Microscopy

ssDNA - Ácido Desoxirribonucleico de Fita Simples

T. rubrum - *Trichophyton Rubrum*

TB - Tuberculose

UTI - Unidade De Terapia Intensiva

V - Volt

VC: voltametria cíclica

VPD: voltametria de pulso diferencial

W: impedância de Warburg

WHO - World Health Organization

Sumário

Apresentação.....	1
Capítulo 1 – Fundamentação teórica.....	2
1. Introdução.....	3
1.2 <i>Candida auris</i>	5
1.3 <i>Trichophyton rubrum</i>	10
1.4 Biossensores.....	14
1.5 Classificação de biossensores quanto aos transdutores.....	16
1.5.1 Biossensores piezoelétricos, calorimétricos e ópticos.....	16
1.5.2 Biossensores eletroquímicos.....	17
2. Espectroscopia de Impedância Eletroquímica.....	21
3. Classificação de biossensores quanto aos elementos de reconhecimento.....	21
4. Ninidrina e 4-aminofenol.....	23
5. Referências.....	26
Capítulo 2 - Ninhydrin as a novel DNA hybridization indicator applied to a highly reusable electrochemical genosensor for <i>Candida</i> <i>auris</i>.....	39
1. Introduction.....	40
2. Material and Methods.. ..	41
2.1. Chemicals and biomolecules.	41
2.2. Instrumentation.....	41
2.3. Molecular modeling and computational protocol.. ..	41
2.4. Fabrication of genosensor and <i>Candida auris</i> gDNA detection.....	41
2.5. Selectivity, regeneration and stability assays.....	41
2.6. Statistics and data presentation.....	42
3. Results and discussion.....	42
3.1. Optimization of probe DNA immobilization on gold electrode.....	42
3.2. Performance evaluation of genosensor....	42
3.2.1. Calibration curve and sensibility.....	42
3.2.2. Selectivity, reusability and stability.....	43
3.3. Evaluation of the genosensor by bioinformatics, EIE and morphological analysis.....	44

3.3.1. Computational analysis of ninhydrin in complex with DNA....	44
3.3.2. Electrochemical impedance spectroscopy and morphological analysis.....	44
4. Conclusion.....	45
Credit author statement.....	46
Declaration of competing interest.....	46
Acknowledgements.....	47
Appendix A. Supplementary data.....	47
References.....	47
References.....	48
Capítulo 3 – TRICHOPHYTON RUBRUM ELECTROCHEMICAL DETECTION USING 4-AMINOPHENOL AS A NOVEL DNA HYBRIDIZATION INDICATOR.....	49
Title, authors, affiliations and Highlights.....	50
Resumo, abstract.....	53
1. Introduction.....	52
2. Material and methods.....	54
2.1 Reagents and instrumentations.....	54
2.2 Fabrication of genosensor for <i>T. rubrum</i> gDNA detection.....	54
2.3 Computational protocol.....	56
2.4 Calibration curve and Interference assay.....	57
2.5 Specificity, regeneration and stability of the genosensor.....	57
2.6 Morphological analysis.....	58
2.7 Statistics and data presentation.	58
3. RESULTS AND DISCUSSION.....	58
3.1 Computational analysis of aminophenol as DNA hybridization indicator.....	58
3.2 Calibration curve... ..	60
3.3 Interference assay.....	62
3.4 Selectivity, regeneration and stability assays.....	63
3.5 Morphological assays.. ..	65
4. Conclusion....	66
Acknowledgments... ..	66
5. References.....	67

Apresentação

xi

Os biossensores são dispositivos analíticos que permitem a detecção de interações moleculares e convertê-las em um sinal elétrico detectável. Os biossensores envolvem evento de combinação dos elementos biológicos, como enzima, DNA, RNA, células, oligonucleotídeos e transdutores, como eletroquímicos, ópticos, piezelétrico e calorimétricos.

Os biossensores são dispositivos analíticos que permitem a detecção de interações moleculares e convertê-las em um sinal elétrico detectável. Os biossensores envolvem evento de combinação dos elementos biológicos, com enzimas, DNA, RNA, células, oligonucleotídeos e transdutores, como: eletroquímicos, ópticos, piezelétricos e calorimétricos.

A capacidade de converter as interações bioquímicas em um sinal elétrico detectável e quantificável é o principal recurso dos biossensores. Além disso, a análise eficiente de mudanças mínimas que acontecem durante o processo biológico, como várias biomoléculas interagem, requer atenção. Nesse sentido, os biossensores são desenvolvidos para diagnóstico proficiente de doenças, qualidade dos alimentos e várias aplicações ambientais. No campo da saúde, os biossensores são desenvolvidos para a exata e precisa detecção de patógenos, tumores, toxinas e biomarcadores para identificar o início de vários distúrbios em um estágio.

Os biossensores ganharam relevância devido o seu baixo custo de fabricação, tempo de resposta rápido, portabilidade, capacidade de quantificar elementos biológicos em minúsculas escalas, alta especificidade e sensibilidade. Logo, a presente tese de doutorado teve como objetivo o desenvolvimento de genossensores eletroquímicos para a detecção de fungos patogênicos, *Candida auris* e *Trichophyton rubrum*. A tese é composta por um referencial teórico, capítulo 2 o qual é referente a um genossensor eletroquímico para detecção do DNA do fungo *Candida auris* e o capítulo 3 apresenta um genossensor para a detecção eletroquímica específica para o fungo *Trichophyton rubrum*.

Capítulo 1: *Fundamentação teórica*

1. Introdução

O reino fungi consiste em um grupo distinto dos eucarióticos que se alimentam de organismos vivos, mortos ou de matéria orgânica. Os fungos são encontrados na natureza, desempenhando um papel essencial no retorno de nutrientes ao solo retirado pelas plantas, como o glicogênio, que é a principal substância de reserva dos fungos (BAZZICALUPO, A. 2022; JENKS, J. D. *et al.*, 2020). Os fungos apresentam diferentes formas e tamanhos, e são divididos em três principais grupos: os fungos filamentosos multicelulares (bolors), os fungos unicelulares (levedura) e os fungos com diformismo, os quais são capazes de mudar seu crescimento para a forma multicelular ou unicelular, dependendo do meio em que se encontram (CASADEVALL, A. 2022; JENKS, J. D. *et al.*, 2020).

Os fungos patogênicos podem se comportar como parasitas em plantas, animais e seres humanos (JENKS, J. D. *et al.*, 2023). Devido a isso, esses fungos apresentam uma das principais causas de infecções oportunistas em animais e humanos, acometendo, principalmente, pessoas imunocomprometidas, as quais se não forem diagnosticadas de forma rápida e precisa para conduzir o tratamento adequado, podem causar graves problemas na saúde ou ir à óbito (LOPES, J. P. *et al.*, 2022; KIBBLER, C. *et al.*, 2017).

No entanto, na maioria dos casos, os indivíduos saudáveis são capazes de prevenir os ataques de fungos com suas respostas imunológicas. Contudo, os fungos patogênicos têm grande impacto na vida humana uma vez que podem infectar o corpo humano e causar diversas doenças, desde infecções superficiais até infecções invasivas e sistêmicas (CASADEVALL, A. 2022).

As infecções fúngicas invasivas apresentam uma incidência menor que as infecções brandas, entretanto, elas são mais preocupantes porque estão associadas à alta morbidade e mortalidade, sobretudo por patógenos fúngicos que infectam um hospedeiro com um sistema imunológico enfraquecido devido alguma doença subjacente, como por exemplo doença pulmonar crônica, tuberculose (TB), vírus da imunodeficiência humana (HIV), câncer e diabetes *mellitus* (Vinayagamoorthy. K., Pentapati, K. C., Prakash, H. 2022). Além disso, os pacientes gravemente enfermos em uma unidade de terapia intensiva (UTI), pacientes submetidos a procedimentos médicos invasivos, recebendo antibióticos de amplo espectro e aqueles que tomam medicamentos imunossupressores

também apresentam maiores riscos de saúde em frente às infecções fúngicas (VINAYAGAMOORTHY. K.; PENTAPATI, K. C.; PRAKASH, H. 2022; SANYAOLU, A. *et al.*, 2022).

Dessa forma, na figura 1, é demonstrado as pernas de um paciente imunocomprometido e infectado com o fungo *Trichophyton rubrum* (*T. rubrum*), o qual apresenta formação de tumores em seus membros devida à infecção fúngica. Entre as espécies fúngicas, cerca de 100 espécies estão associadas a infecções humanas e apenas algumas espécies causam as infecções invasivas mais comuns em indivíduos imunocomprometidos, como a infecção por *T. rubrum* (CRUZ, WUEST, 2023).



Figura 1- Paciente imunossuprimido com infecção fúngica de *T. rubrum* (imagem modificada de XIA, J. G. Et al., 2022).

De fato, várias infecções causadas por fungos patogênicos estão presentes em pacientes com SARS-CoV-2 ou coronavírus (COVID-19) (VASEGHI *et al.*, 2022). A pandemia do COVID-19 foi associada a um aumento na incidência de infecções fúngicas

invasivas mórbidas, consequentemente, podendo levar à morte (VINAYAGAMOORTHY *et al.*, 2022).

Ademais, os fungos patogênicos e as infecções causadas por eles necessitam de uma atenção crescente da saúde pública global. De tal maneira que os casos de doenças fúngicas invasivas (IFI) estão aumentando à medida que a população de imunocomprometidos continuam a se expandir. Isso se deve a inúmeros fatores, incluindo avanços na medicina, acessibilidade a terapias e intervenções médicas, as quais podem enfraquecer o sistema imunológico, como quimioterapia, imunoterapia para câncer e transplante de órgãos sólidos (WHO, 2022).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a ameaça global emergente de doenças fúngicas invasivas é agravada pelo rápido surgimento de resistência de medicamentos antifúngicos, acesso limitado a diagnósticos e tratamentos de qualidade (WHO, 2022). A resistência antifúngica tem grandes implicações para a saúde humana, resultando em uma terapia prolongada, internações hospitalares e uma maior necessidade de medicamentos antifúngicos, os quais podem ser caros e muitas vezes altamente tóxicos, o que pode contribuir para o aumento da morbidade e da mortalidade (DENNING, D. W., 2022).

1.1. *Candida auris*

O fungo *Candida auris* (*C. auris*) foi relatado pela primeira vez em 2009 no Japão, em que foi isolado da orelha externa e se revelou como um fungo multirresistente (RYBAK, M.; CUOMO, A.; ROGERS, D. P. 2022). As cepas invasivas de *C. auris* tornaram-se prevalentes em pacientes hospitalizados em todo o mundo. Na Figura 2, é destacado em azul as regiões onde foram registrados casos de *C. auris* (SANYAOLU, A. *et al.*, 2022).



Figura 2 - A imagem apresenta a distribuição mundial de *C. auris* em 2022. Nas regiões do leste e sul asiático, África do Sul, América do Sul e na América do Norte (imagem modificada de SANYAOLU, A. *et al.*, 2022; DU, H. *et al.*, 2020).

Especificamente nos Estados Unidos, o primeiro caso foi registrado em 2013 de um paciente que foi transferido dos Emirados Árabes (FORSBERG, K. *et al.*, 2019). Em fevereiro de 2018, foram registrados mais de 250 casos de *C. auris* em Nova Jersey (FORSBERG, K. *et al.*, 2019). No início de 2022, os Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) registraram 5071 casos de *C. auris* nos Estados Unidos. De maneira que, o CDC relatou 389, 361 e 288 casos confirmados de *C. auris* resistente a medicamentos nos estados da Califórnia, Flórida e Nova York, respectivamente (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2022). Além disso, o CDC relatou que os casos clínicos de *C. auris* aumentaram de 38 casos entre 2013-2016 para mais de 5 mil em 2022 em todo o país (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2022).

A epidemiologia demonstra que os casos de *C. auris* foram diagnosticados, sobretudo, em pacientes hospitalizados recebendo medicamentos antifúngicos, de modo que a ingestão constante desses medicamentos resultou no surgimento de organismos resistentes no ambiente de saúde (FORSBERG, K. *et al.*, 2019). Como também, as mudanças climáticas antropogênicas foram responsáveis pelo surgimento de cepas de *C. auris* associadas à tolerância térmica (CASADEVALL, A.; KONTOYIANNIS, D. P.;

ROBERT, V. 2019). De forma que a patogenicidade das espécies de *Candida* é devida à resposta de algumas biomoléculas em contato com o fungo, potencializando os fatores de virulência dele. Essas biomoléculas são, principalmente, as manosil transferases, proteases e lipases secretadas, transportadores de ferro baseados em sideróforos, oligopeptídeos (BRAVO, R. G, LORENZ, A. 2021). A participação dessas biomoléculas ocorre quando há invasão de patógenos, colonização e acesso aos nutrientes do corpo do hospedeiro (HANSON, K. E. 2018). Além disso, outros fatores aumentam a virulência das espécies de *Candida*, tais como: a formação de biofilme, mutação do alvo do medicamento, a superexpressão do alvo da droga e a limitação da ingestão/efluxo (ZAMITH-MIRANDA *et al.*, 2019).

Isto posto, os fatores de virulência podem influenciar a ação dos medicamentos antifúngicos, como por exemplo a farmacodinâmica do fluconazol consiste na prevenção do crescimento celular do fungo através da inibição da síntese de ergosterol, especificamente lanosterol 14- α -demetilase, o qual é codificado pelo gene ERG11 (HOU, X. *et al.*, 2018). No estudo de Rui-Gaitán *et al.*, (2018) foi deduzido que as mutações em alguns genes, como o ERG11, Y132F, K143R e F126L ofereceram resistência ao fluconazol (RUIZ-GAITÁN, A. *et al.*, 2018).

A contaminação por *C. auris* em humanos apresenta os seguintes sintomas: infecções na corrente sanguínea; infecção urinária; febre; calafrios; infecções de feridas; infecções no ouvido; infecções no pulmão e na bexiga (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2022). Além disso, a infecção desse fungo em pessoas que precisaram ser internadas com tubos respiratórios, tubos de alimentação, cateteres venosos centrais e indivíduos com doenças imunológicas ou com sistema imune debilitado como diabetes e câncer, os quais são os maiores grupos de risco da infecção por *C. auris* (SHANNON, K. *et al.*, 2022). Na Figura 3, apresenta uma fotografia de uma paciente que estava em tratamento de Lúpus, o qual era necessário utilizar um cateter. Entretanto, essa linha intravenosa foi infectada por *C. auris*, como consequência, a infecção invadiu o sistema circulatório da paciente, ocasionando uma infecção generalizada (THE NEW YORK TIMES, 2019).



Figura 3- Fotografia de uma paciente com a família durante um tratamento visando reduzir os sintomas de lúpus. Logo após, a paciente foi transferida para UTI, devido a uma infecção de *C. Auris*, a qual entrou no sistema circulatório da paciente através de um cateter. Alguns dias depois do diagnóstico a paciente faleceu devido a infecção (THE NEW YORK TIMES, 2019).

A *C. auris* surgiu no Brasil na cidade de Salvador, em dezembro de 2020, onde foram transferidos dois pacientes, os quais estavam com COVID-19, na mesma unidade de terapia intensiva e ambos mostraram sinais de inflamação e de infecções, logo foram realizados ensaios clínicos e constataram infecção por *C. auris*. Portanto, foram administrados os antifúngicos: 1 µg/mL, 2 µg/mL, 0,03 µg/mL e 0,06 µg/mL para anfotericina B, fluconazol, voriconazol e anidulafungina, respectivamente. Entretanto apenas um paciente após 50 dias de internação não sucumbiu a infecção (ALMEIDA *et al.*, 2021), de modo que as superinfecções por *C. auris* em pacientes críticos com COVID-19 têm sido relacionadas a altas taxas de mortalidade em até 30 dias, geralmente acima de 50%, devido a saúde e ao sistema imune do paciente estarem inábeis a combater tal infecção (CHOWDHARY, A. *et al.*, 2020).

A resistência ao número limitado de agentes antifúngicos entre os fungos patogênicos representa uma crescente ameaça à saúde pública. Particularmente, o fungo patógeno *C. auris* que apresenta resistência à classe de antifúngicos triazólicos e à anfotericina B (CHISHOLM-BURNS *et al.*, 2016; JACOBS, E. *et al.*, 2022). Isto posto, há apenas três classes de medicamentos antifúngicos os quais são utilizados para tratamento de infecções graves por *Candida*: os polienos (anfotericina B), os triazóis (fluconazol, voriconazol, isavuconazol, itraconazol ou posaconazol) e as equinocandinas (caspofungina, micafungina e anidulafungina). A anfotericina B é apenas administrada de modo intravenoso e seu uso é limitado pela alta toxicidade (MORAES, D. 2022; CHISHOLM-BURNS, *et al.*, 2016). Os antifúngicos triazólicos, como o fluconazol, são significativamente menos tóxicos, baratos e estão disponíveis para administração oral como também intravenosa. Por fim, as equinocandinas, a qual é considerada como terapia de primeira linha para candidíase invasiva, também são menos tóxicas, mas estão disponíveis apenas para administração intravenosa (CHISHOLM-BURNS, *et al.*, 2016).

Dessa maneira, dentro dos três agentes antifúngicos, a *C. auris* possui resistência a todas as três classes de medicamentos citados (polienos, triazóis e equinocandinas) (MORAES, D. 2022; CHISHOLM-BURNS, *et al.*, 2016). De modo que duas classes antifúngicas, os polienos e triazóis, foram observados que em 40% das amostras de *C. auris* apresentaram resistência a essas drogas e, aproximadamente, 4% apresentaram resistência a todas as três classes de drogas (FASCIANA, T. *et al.*, 2020, JACOBS, E. *et al.*, 2022). O estudo de Chow *et al.*, (2018) corroboram com esses resultados, após analisar 300 amostras isoladas de *C. auris*, observaram que 24% eram resistentes a pelo menos duas classes de antifúngicos, 1,0% eram resistentes a todas as três classes, especificamente, 7% à micafungina, 23% à anfotericina B, e 80,0% para fluconazol (CHOW, N. A. *et al.*, 2018; ZAMITH-MIRANDA, D. *et al.*, 2019).

Portanto, a infecção por *C. auris* requer um diagnóstico rápido para conduzir o tratamento a fim de retardar a proliferação do fungo no corpo do paciente. O *C. auris* compartilha características importantes com outras espécies de *Candida* menos letais, resultando em erros de identificação frequentes com métodos fenotípicos e bioquímicos tradicionais (FASCIANA, T. *et al.*, 2020). Quando não reconhecido, o fungo pode persistir em superfícies ambientais por dias, possibilitando a disseminação entre pacientes em unidades de saúde. Sendo que, caso ocorra um surto, o controle da situação pode se

tornar extremamente difícil, uma vez que os métodos convencionais não oferecem a precisão diagnóstica necessária. Dessa forma, as abordagens convencionais são muitas vezes não viáveis, como hemoculturas, cultura de microrganismos, e reação em cadeia da polimerase (PCR). Contudo, tais métodos são dispendiosos, requerem técnicos especializados e possuem metodologias que necessitam de muito tempo para concluir o diagnóstico (FASCIANA, T. *et al.*, 2020; RANA *et al.*, 2023).

1.2 *Trichophyton rubrum*

As dermatofitoses são infecções fúngicas dos tecidos queratinizados, como pele, pelos e unhas. Sendo que os fungos filamentosos utilizam a queratina desses tecidos como fonte de nutrientes. Este grupo de fungos representa 45 espécies agrupadas em três gêneros: *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*. Entre os agentes, o mais comum é o *T. rubrum* (LACAZ *et al.*, 2022). O *T. rubrum* é um dos principais agentes que infecta humanos, sendo responsável pela maioria das dermatofitoses humanas (ZHANG *et al.*, 2023). Os dermatófitos se desenvolvem em temperaturas de 25-28°C e a infecção na pele humana os mantém em condições quentes e úmidas. Dessa maneira, as infecções fúngicas superficiais são relativamente comuns em países tropicais (CHOWDHARY *et al.*, 2022).

O *T. rubrum* pode promover infecções em partes do corpo distintas, conforme a área afetada haverá diferentes sintomas. As regiões do corpo mais comum a serem infectadas são: dermatofitose do corpo, dermatofitose dos pés, dermatofitose ungueal ou onicomicose, dermatofitose do couro cabeludo, dermatofitose das dobras da virilha e nas dobras dos pés (popularmente conhecida de pé de atleta) (NORIMATSU, YUTA; NORIMATSU, YURIE 2022). Dessa maneira, os quadros clínicos mais recorrentes são nas regiões da pele sem pelos ou com poucos, são caracterizadas por lesões avermelhadas, descamativas, desenhadas ou isoladas (NORIMATSU, YUTA; NORIMATSU, YURIE, 2022; ZHANG, R. *et al.*, 2023; FAN *et al.*, 2023).

Nas onicomicoses, há presença de lesões destrutivas e há acúmulo de queratina debaixo da unha (ceratose subungueal). Na virilha, as lesões são avermelhadas e descamativas as quais afetam parte ou toda a área do púbis, expandindo-se para região abdominal inferior e para as nádegas (MADARASINGHA, NAYANI P. *et al.*, 2022), como

observado na figura 4. O pé de atleta (frieira) pode afetar as dobras interdigitais e vir associado à onicomicose, o que prejudica a performance de inúmeros atletas (TREADWELL, S. *et al.*, 2022).

No estudo de Peixoto e colaboradores (2011) apresentaram o caso clínico de uma paciente com HIV a qual procurou um endocrinologista por apresentar ganho ponderal de 40 kg e amenorréia secundária. Como laudo do exame dermatológico, foi verificado fácies de lua, estrias avermelhadas e largas nos braços e abdome e hematomas. Além disso, apresentou placas esbranquiçadas sobre a lâmina ungueal do polegar esquerdo (figura 4). Logo, após o exame micológico, foi confirmada a hipótese clínica de onicomicose branca superficial causada pelo *T. rubrum* (PEIXOTO *et al.*, 2010).



Figura 4 - Em (A) observa-se placas não pruriginosas, eritemato-acastanhadas, descamativas, sobretudo nas bordas, nas dobras axilares e inguinais espalhadas para tronco, abdome, coxas e joelhos. Em (B) observa-se um paciente com eritema, pápula e nódulos na área submandibular e pescoço, bochecha direita e esquerda e no peito. Paciente foi curado após 6 meses de tratamento. Na imagem (C) apresenta placas esbranquiçadas sobre a lâmina ungueal do polegar esquerdo (imagens modificadas de PEIXOTO *et al.*, 2010 e SU, H. *et al.*, 2017).

Além disso, as pessoas com diabetes *mellitus* devem estar atentas à saúde dos

pés e evitar o intertrigo, o qual pode acarretar infecções bacterianas no tecido mole das pernas e pés, causando quadros de erisipela (infecção cutânea) podendo provocar a perda do membro (EKENG, E. WINNIE KIBONE, E. 2022; CONNIE CAÑETE-GIBAS, WIEDERHOLD, P. 2023). No estudo clínico de Norimatsu, Y. e Norimatsu, Y. (2022), foi apresentado um caso de dermatomicose profunda causada por *T. rubrum*. Nesse caso, um homem de 75 anos apresentou pústulas, como demonstrado na Figura 5, em seguida, foi realizada biópsia de pele. Como resultado, a cultura de tecidos revelou a presença de *T. rubrum*, logo o paciente foi tratado com luliconazol tópico e fosravuconazol 100 mg/dia oral por 84 dias (NORIMATSU, Y. NORIMATSU, Y. 2022).



Figura 5 - Paciente com pústulas após a vacinação por SARS-CoV-2 BNT162b2 (NORIMATSU, Y. NORIMATSU, Y. 2022).

A resistência fúngica aos medicamentos também foi descrita no caso do dermatófito *T. rubrum* (PERES *et al.*, 2010; LOGAN, A.; WOLFE, A.; WILLIAMSON, J. C., 2022). Essa

falha terapêutica pode aumentar a prevalência dessa doença, dessa forma é necessário mais estudo em relação às infecções fúngicas em humanos (LOGAN, A.; WOLFE, A.; WILLIAMSON, J. C., 2022). Como também, a incidência de infecções dermatofíticas aumentou devido a elevação do número de pacientes com sistema imunológico comprometido ou pacientes que sofrem de diabetes *mellitus* (LOGAN, A.; WOLFE, A.; WILLIAMSON, J. C., 2022; WANG, G. *et al.*, 2023).

No estudo de Rui Kano, Hiromitsu Noguchi e Masataro Hiruma (2022), foi realizado a deleção do gene que codifica a esqualeno epoxidase (SQLE) em uma cepa de *T. rubrum*. De modo que a proteína SQLE é o alvo do medicamento Terbinafina, sendo fundamental para a síntese da membrana celular em dermatófitos. Com esse estudo, foi descoberto que as células dermatofitias sofrem mutações genéticas para evitar os efeitos dos agentes antifúngicos (RUI KANO; HIROMITSU NOGUCHI; MASATARO HIRUMA 2022). Logo, o *T. rubrum* pode causar uma infecção crônica, devido às diferenças fenotípicas, em comparação com outras espécies de Trichophyton, como nos componentes da parede celular, especialmente as galactomananas. Sendo que as galactomananas de *T. rubrum* podem ter efeitos imunossupressores, inibindo as reações imunes normais como a linfoproliferação (ZHANG, P.; LIU, W. 2023).

O principal método de diagnóstico do *T. rubrum* é através da observação de características macroscópicas e microscópicas exclusivas deste fungo como ensaios micológicos e o uso de microscópios para identificar a morfologia do fungo, por exemplo: Método de difusão em disco e ensaio colorimétrico MTT (SAFI-SAMGHABADI, A.; ATYABI, S. M.; RAZZAGHI-ABYANEH, M. 2022); como também por PCR (NAVARRO-PÉREZ *et al.*, 2023). Entretanto, é importante salientar que os ensaios microbiológicos, requerem o uso de reagentes em grande quantidade, mão de obra qualificada, equipamentos dispendiosos, manutenção de alto custo e são demorados, pontos que podem inviabilizar a aplicação destes (ARIFFIN *et al.*, 2022).

Em vista disso, o desenvolvimento de métodos rápidos, de fácil compreensão, acessíveis, sensíveis, específicos e que proporcionam uma rápida detecção e monitoramento da doença em tempo real é crucial para o tratamento. Especialmente para a detecção de fungos patogênicos, como *C. auris* e *T. rubrum*, podem auxiliar o médico para um tratamento eficiente. Logo, os biossensores têm chamado muita à atenção devido às suas características como sensibilidade, rápido tempo de resposta e baixo custo. De

modo que são aplicados em diversas áreas, como nas indústrias farmacêuticas (MA *et al.*, 2022), no monitoramento ambiental (WANG *et al.*, 2023), na indústria de alimentos (ZHENG *et al.*, 2023) e em detecção de doenças (MOHAMMADPOUR-HARATBAR *et al.*, 2023).

1.3 Biossensores

De acordo com a IUPAC, os biossensores são dispositivos que usam reações bioquímicas específicas mediadas por biorreceptores, como enzimas isoladas, tecidos, organelas ou células inteiras para detectar compostos químicos, normalmente, por sinais elétricos, térmicos ou ópticos (MCNAUGHT, A., WILKINSON, A. 1997). Dessa forma, esses dispositivos são constituídos por um transdutor, responsável em converter uma reação bioquímica em um sinal mensurável; um elemento de reconhecimento biológico, que é responsável pela especificidade do dispositivo, como demonstra a Figura 6 (EUN RYUNG KIM *et al.*, 2022; RAMESH 2023; ZHU *et al.*, 2022).

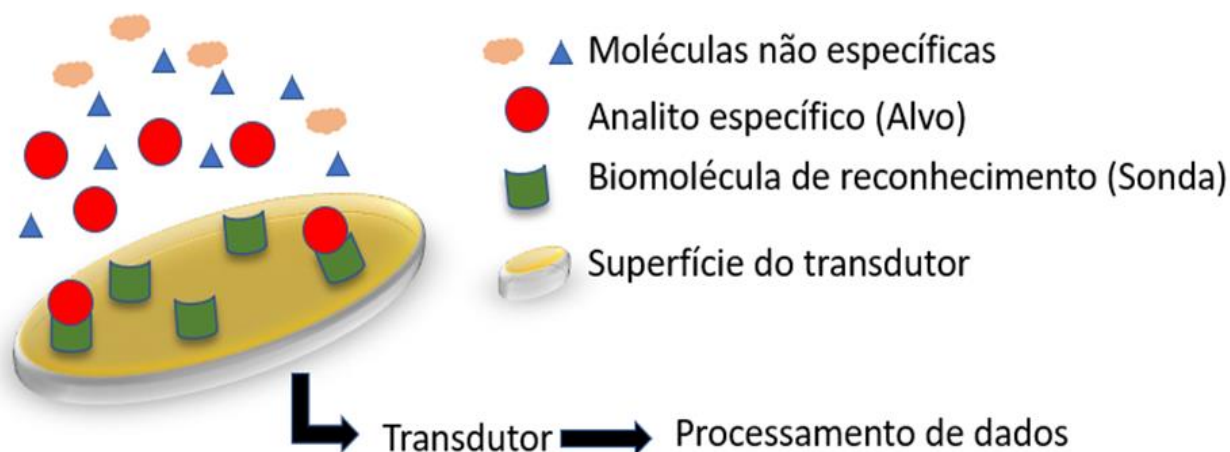


Figura 6 - Esquema representativo de um biossensor (fonte: autoria própria).

O conceito de biossensor foi primeiramente aplicado por Leyland C. Clark em 1962, quando propôs a incorporação de enzimas a eletrodos existentes para a construção de novos equipamentos bioanalíticos (CLARK; LYONS, 1962). Precisamente, a enzima

glicose oxidase foi imobilizada a um eletrodo de platina para a detecção de glicose, estabelecendo uma das classes de biossensores, os enzimáticos (EUN RYUNG KIM *et al.*, 2022).

Desse modo, houve um aumento do número e diversidade de aplicações, abrangendo áreas como o monitoramento e controle de qualidade de alimentos e processos industriais (OH *et al.*, 2022), aplicações clínicas e farmacêuticas (LV *et al.*, 2022), monitoramento agrícola e ambiental (CHAUDHARY, 2022) e aplicações militares (POHANKA, 2022), entre outros. As vantagens como especificidade, sensibilidade, rapidez, precisão, miniaturização, potencial para portabilidade, simplicidade e baixo custo fazem dos biossensores alternativas promissoras às metodologias analíticas convencionais (RAMESH, 2023). Especialmente em regiões com recursos limitados, como áreas rurais ou de difícil acesso, periferias de países em desenvolvimento, a disponibilidade de testes rápidos e de fácil uso pode tornar o diagnóstico de doenças mais rápido e preciso, influenciando diretamente a estratégia de tratamento e a sobrevivência dos pacientes (CASTRO, A. C. H. *et al.*, 2022).

Os biossensores podem ser classificados de diferentes maneiras de acordo com parâmetros específicos, como observado na Figura 7, tais como o elemento de reconhecimento biológico utilizado e o método de transdução do sinal (SINGH *et al.*, 2021).

Portanto, em vista da supressão de métodos de diagnósticos rápidos, precisos e simples para fungos patogênicos, neste trabalho, foram aplicadas técnicas eletroquímicas para o desenvolvimento de biossensores para a detecção do DNA dos fungos *C. auris* e *T. rubrum*.

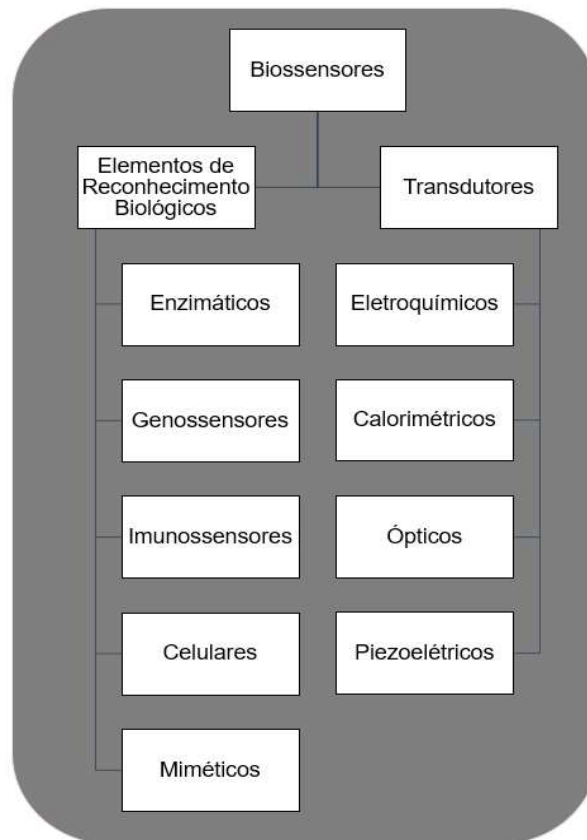


Figura 7 - Diagrama de diferentes categorias de biossensores, de acordo com o elemento de reconhecimento biológico e de transdutores (fonte: autoria própria).

1.4 Classificação de biossensores quanto aos transdutores

Os biossensores podem ser classificados de acordo com a técnica utilizada na transdução de sinal. O transdutor é um componente do biossensor que desempenha um importante papel no processo de detecção do sinal, logo, o transdutor pode ser determinado como um dispositivo que detecta e transforma reações bioquímicas em um sinal mensurável (LIU-NA WEI *et al.*, 2023). No que se refere ao tipo de transdutor, os biossensores são classificados em piezoelétricos, calorimétricos, ópticos e eletroquímicos.

1.4.1 Biossensores piezoelétricos, calorimétricos e ópticos

Os biossensores piezoelétricos detectam a mudança na massa devida à interação do alvo com o elemento de reconhecimento, produzindo um sinal elétrico mensurável.

Assim, eles são baseados no efeito piezoelétrico, de maneira que os materiais sólidos acumulam carga elétrica em resposta a tensões mecânicas. A principal vantagem desta técnica inclui a possibilidade de realizar medições diretas sem marcações do processo de ligação, englobando a análise em tempo real da cinética de ligação (JAIN *et al.*, 2023).

Em relação aos biossensores calorimétricos, esses dispositivos exploram a propriedade de absorção ou liberação do calor das reações bioquímicas. O conceito do biossensor calorimétrico envolve a medição das variações de temperatura na reação entre o elemento de reconhecimento e um analito alvo; essa alteração de temperatura pode ser correlacionada com a quantidade de reagentes consumidos ou produtos formados, com a medição do calor liberado ou consumido (KAUR *et al.*, 2023).

Os biossensores ópticos baseiam-se em um sinal óptico o qual apresenta mudança na fase, amplitude, polarização ou frequência da luz de entrada, em resposta aos processos de reconhecimento. Nos sensores ópticos, a luz é responsável em determinar a medida da reação bioquímica que acontece na superfície do eletrodo. Desse modo, pode-se analisar a luz que é absorvida ou emitida, ou sua refração devida à reação biológica entre a sonda e o analito alvo (EKSIN, E.; ERDEM, A. 2023).

1.4.2 Biossensores eletroquímicos

Os biossensores eletroquímicos baseiam-se no consumo e/ou geração de espécies eletroativas durante uma interação química e biológica. Nesse processo o transdutor detecta e mensura o sinal eletroquímico produzido por essa interação (LIU-NA WEI *et al.*, 2023). Com as técnicas eletroquímicas, é possível analisar relações diretas entre a concentração do analito e propriedades elétricas como corrente, potencial, condutividade, resistência ou carga. Logo, essas técnicas são aplicadas na quantificação de espécies de interesse em distintas áreas de estudo (ZHANG, X. *et al.*, 2023). Os biossensores eletroquímicos são dispositivos que dependem de propriedades elétricas (resistência, corrente, potencial, capacitância, impedância), que são detectadas e medidas com os métodos de potenciometria, condutometria, amperometria ou voltametria (LIU-NA WEI *et al.*, 2023).

A técnica de voltametria foi desenvolvida pela primeira vez por Jaroslav Heyrovsky

em 1922, o que resultou no Prêmio Nobel de Química em 1959 (NOBEL PRIZE, 2023). O conceito de voltametria refere-se às técnicas nas quais a corrente é medida variando-se o potencial em uma faixa definida. A resposta de corrente é observada como um pico ou um platô proporcional à concentração do analito (LIU-NA WEI *et al.*, 2023). O gráfico de corrente *versus* potencial, voltamograma, apresenta informações sobre a reação química e a posição da corrente de pico está vinculada à substância química específica, de modo que os valores de corrente de pico são proporcionais à concentração da espécie correspondente (LIU-NA WEI *et al.*, 2023).

Logo, na voltametria, um potencial em função do tempo é aplicado a um eletrodo de trabalho, alterando o seu potencial em relação a um potencial fixo de um eletrodo de referência. A corrente resultante flui entre o eletrodo de trabalho e um eletrodo auxiliar a qual é medida em função do potencial (CHENG, T., ZHANG, W., YANG. 2022). Como apresentado na Figura 8, o eletrodo de trabalho é onde ocorre a reação de interesse (redução ou oxidação), de modo que os principais tipos de eletrodos de trabalho são: ouro, carbono vítreo, pasta de carbono, grafite, platina, prata, etc. O eletrodo de referência tem um potencial conhecido e é usado para estabelecer o potencial constante em uma célula eletroquímica, ou seja, o potencial de prata/cloreto de prata mais comumente usado em soluções aquosas. Finalmente, o eletrodo auxiliar (ou contra eletrodo) é utilizado para completar o circuito elétrico na célula eletroquímica e é composto por materiais inertes como platina, ouro, grafite ou carbono vítreo (WHITTINGHAM *et al.*, 2021).

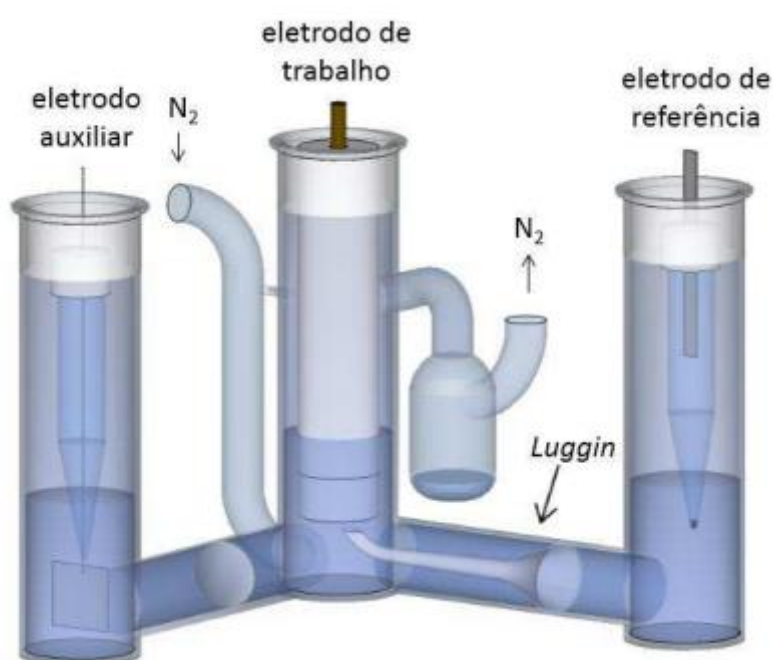


Figura 8 - Demonstração de uma célula eletroquímica de três compartimentos, com os eletrodos posicionados. São destacadas as regiões de entrada e saída de gás nitrogênio, bem como o capilar de Luggin, que tem a função de aproximar os eletrodos de trabalho e referência. E a entrada e saída de nitrogênio (N_2) (Fonte: autoria própria). Os métodos voltamétricos incluem voltametria de varredura linear, voltametria cíclica, voltametria de pulso diferencial, voltametria de onda quadrada, polarografia, voltametria hidrodinâmica e voltametria de redissolução (LIU *et al.*, 2022). A seleção do método voltamétrico a ser aplicado está condicionado com o tipo e a qualidade de informação quantitativa e/ou qualitativa que deseja obter sobre o analito ou do processo que envolve a interação entre o analito e o eletrodo de trabalho (ZHU *et al.*, 2022).

Neste estudo, foi utilizado as técnicas de voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial como mostrada na Figura 9.

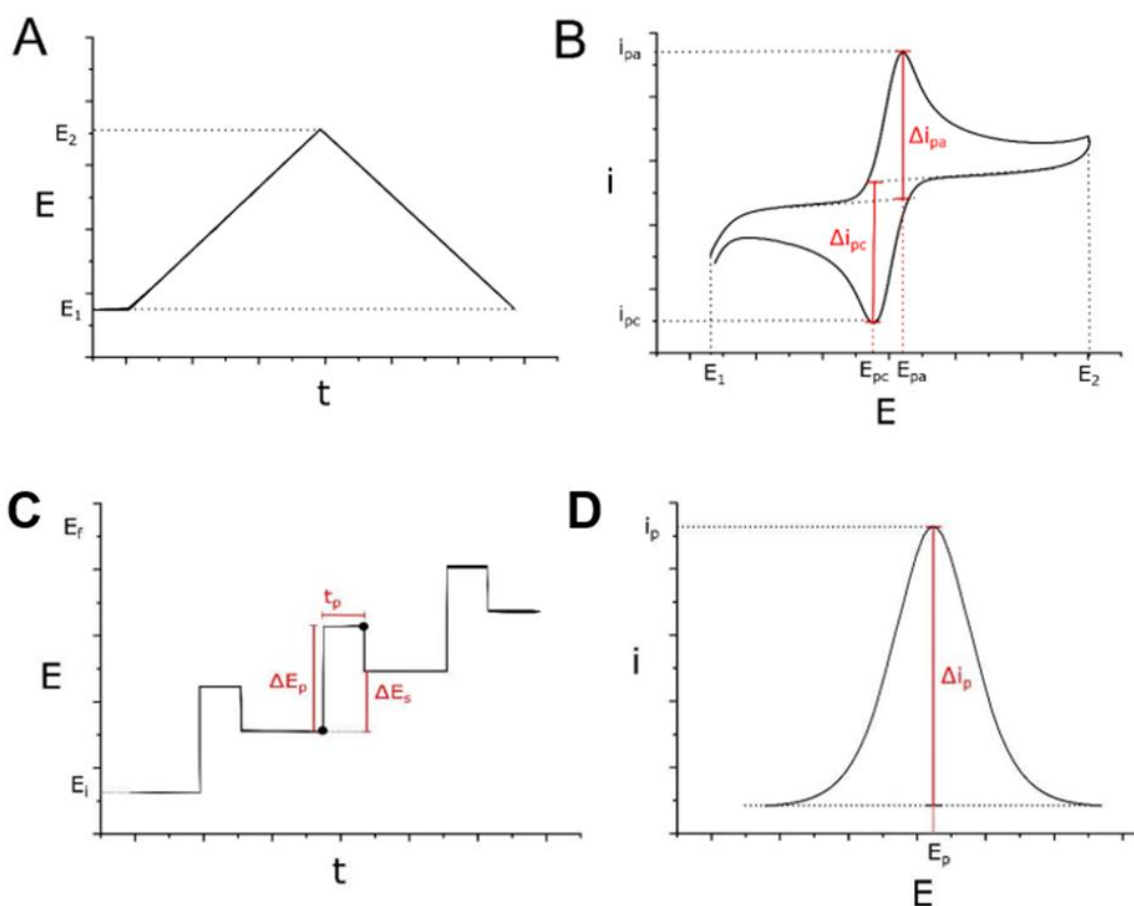


Figura 9 - Representações gráficas da voltametria cíclica. Em (A) Gráfico de potencial em função do tempo: em cada ciclo o potencial é variado de E_1 a E_2 , em seguida retornando

a E1. Em (B) Voltamograma cíclico, com a corrente elétrica em função do potencial. De modo que é possível observar os picos de oxidação e redução. E: potencial elétrico; i: corrente elétrica; E_{pc} : potencial de pico catódico; E_{pa} : potencial de pico anódico; i_{pc} : corrente de pico catódico; i_{pa} : corrente de pico anódico. O delta (Δ) representa a variação de corrente de pico, com a subtração da corrente de pico pela corrente na base do pico. Nos gráficos C e D são representações gráficas da voltametria de pulso diferencial. Em (C) Gráfico de potencial em função do tempo: são aplicados pulsos periódicos de potencial. Os pontos destacados representam a amostragem de corrente para um pulso. Em (D) Voltamograma de pulso diferencial, com a corrente elétrica em função do potencial. Neste exemplo, é possível observar um pico de oxidação. E: potencial elétrico; i: corrente elétrica; ΔE_p : variação de potencial de pulso; ΔE_s : variação de potencial de amostragem; t_p : período de pulso; Δi_p : variação de corrente de pico (Adaptado de LIU *et al.*, 2022).

Na Figura 9A, o potencial inicial (E1) aplicado varia linearmente em um sentido até o potencial final (E2), logo, o sentido da varredura é invertido e o potencial volta ao valor inicial (E1), e seu voltamograma consiste em uma curva fechada. De modo que na presença de compostos eletroativos, podem ser detectados picos de oxidação, em um potencial de pico anódico (E_{pa}) e com corrente de pico anódico (i_{pa}) específicos; e/ou picos de redução, em um potencial de pico catódico (E_{pc}) e com corrente de pico catódico (i_{pc}) específicos De acordo com a Figura 9B. Em relação às correntes de pico, pode ser realizada a subtração da corrente na base do pico, o que resulta na variação de corrente de picos anódico e catódico (Δi_{pa} e Δi_{pc}) (LIU *et al.*, 2022).

A voltametria de pulso diferencial (Figura 9C) é um método no qual pulsos de amplitude fixos sobrepostos a uma rampa de potencial crescente são aplicados ao eletrodo de trabalho. Assim a corrente é medida duas vezes, uma antes da aplicação do pulso e outra ao final do pulso. A primeira corrente é instrumentalmente subtraída da segunda, e a diferença das correntes é plotada *versus* o potencial aplicado. De maneira que o voltamograma resultante consiste em picos de corrente de forma gaussiana, logo a área é diretamente proporcional à concentração do analito (LIU *et al.*, 2022; MANRING *et al.*, 2022).

2. Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

A espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) é um método que mede a impedância de um sistema eletroquímico, como função da frequência de uma perturbação senoidal de baixa amplitude (MANRING *et al.*, 2022). Entre as formas comuns de representação, salienta-se o diagrama de Nyquist, em que dados relativos a diversas frequências são representados em um plano complexo de impedância. Assim como é utilizado o diagrama de Bode, em que são representados os valores absolutos de impedância e deslocamento de fase em função da frequência (MANRING *et al.*, 2022). Os dados obtidos por esta técnica são analisados mediante um modelo teórico de circuito elétrico, que pode possuir elementos que representam a resistência da solução, resistência ao transporte de carga, capacitância entre o eletrodo e os íons carregados na solução e impedância devido à taxa de difusão do composto redox até o eletrodo (BRETT, C. M. A. 2022). A Figura 10 ilustra a representação dos dados impedimétricos pelo diagrama de Nyquist e um modelo de circuito equivalente.

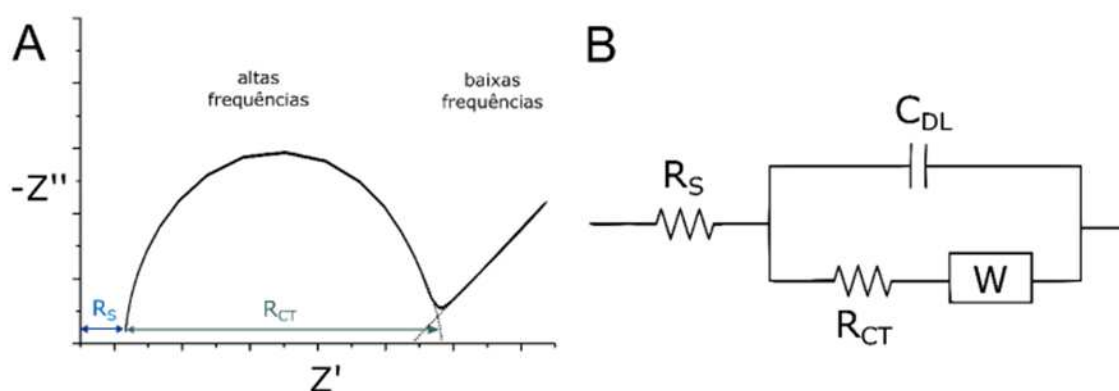


Figura 10 - Espectroscopia de impedância eletroquímica. (A) Diagrama de Nyquist, destacando as regiões de altas e baixas frequências, além dos cálculos de componentes da impedância. (B) Circuito equivalente que serve de modelo para explicar os dados experimentais. R_S : resistência da solução; R_{CT} : resistência à transferência de carga; W : impedância de Warburg; C_{DL} : capacitância (Adaptado de BRETT, C. M. A., 2022).

3. Classificação de biossensores quanto aos elementos de reconhecimento

Na classificação baseada no elemento de reconhecimento biológico consiste em

uma biomolécula imobilizada (sonda) a qual é capaz de detectar o analito alvo específico. É importante que a sonda seja específica, sensível e estável para detectar o analito alvo em uma amostra complexa (CASTRO, A. C. H. *et al.*, 2022). Devido aos avanços na biologia molecular, bioquímica, genética, microbiologia e imunologia, muitas biomoléculas são aplicadas como elemento de reconhecimento biológico para a construção dos biossensores. Em relação ao tipo de biocomponente, são classificados em biossensores enzimáticos (enzimas), imunossensores (anticorpos), genossensores (ácidos nucleicos), aptassensores (aptâmeros) e microbianos (microrganismos) (SHALANNANDA *et al.*, 2023). Em demais sistemas de classificação substituem a categoria de biossensores microbianos por biossensores celulares, incluindo células de organismos multicelulares e culturas de células (MEHRANNIA *et al.*, 2023). Além dessas categorias, existem os biossensores miméticos, cuja sonda é um material que mimetiza determinadas estruturas biológicas (DONG *et al.*, 2022). De forma que os biossensores contendo aptâmeros e peptídeos como biocomponentes podem ser incluídos na classificação de biossensores miméticos (KUÇUK *et al.*, 2023).

O DNA ou ácido desoxirribonucleico é um polímero orgânico constituído por várias unidades de nucleotídeos cuja função é o armazenamento e a transmissão de informação biológica. Com isso, dentre os biossensores, os genossensores são fundamentados em processos de reconhecimento de ácidos nucleicos objetivando a detecção de alvos envolvidos, sobretudo, em doenças genéticas e doenças infecciosas (microrganismos) (CASTRO, A. C. H. *et al.*, 2022). Através dos genossensores é possível o monitoramento de mudanças e interações do DNA, como por exemplo a metilação (COLWELL *et al.*, 2023; LI *et al.*, 2023), dessa forma são considerados promissores dispositivos de diagnóstico clínico alternativos, especialmente, para doenças infecciosas (GUEDES, P. H.G. *et al.*, 2021).

Os genossensores são desenvolvidos por meio da imobilização de fita simples de um ácido nucleico na superfície do eletrodo de trabalho, seguida pelo reconhecimento do seu alvo complementar para formação da dupla hélice de DNA (hua, E. 2022). Assim, os genossensores são considerados métodos analíticos rápidos, sensíveis, simples e conseguem detectar uma sequência de DNA específico em baixíssimo volume de amostras. Logo, os genossensores mostram-se candidatos com grande potencial para aplicações em diagnóstico de doenças genéticas, infecciosas e detecção de

microrganismos patogênicos (FUKU *et al.*, 2022). Os ácidos nucleicos apresentam vantagens para serem aplicados como sonda, pois são facilmente sintetizados, altamente específicos e podem ser reutilizáveis (HUA, YU *et al.*, 2022; CASTRO, A. C. H. *et al.*, 2022; GUEDES, P. H. G. *et al.*, 2021).

Isto posto, os genossensores são promissores para análise de ácidos nucleicos, devido a sua rapidez de resposta, alta sensibilidade e baixo custo. Salientando-se que a detecção pode ocorrer de forma direta, convertendo diretamente a hibridização em sinal elétrico ou de maneira indireta, com o uso de compostos eletroativos que interagem com o material genético, possibilitando a detecção da sequência específica ou monitoramento da integridade da biomolécula (HAO, J. *et al.*, 2023; GARCIA-MELO *et al.*, 2023).

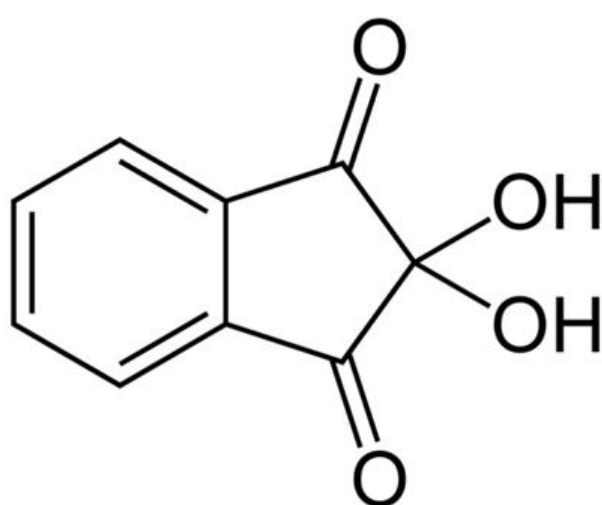
4. Ninidrina e 4-aminofenol

Como dito anteriormente, a detecção de ácidos nucleicos nos genossensores podem ocorrer de dois modos, de modo direto e indireto. A forma de detecção eletroquímica direta ocorre quando são analisados os picos de oxidação ou redução das bases nitrogenadas. A detecção indireta, utiliza compostos eletroativos que interagem com o DNA (Garcia-Melo *et al.*, 2023), como por exemplo: brometo de etídio (CASTRO, A. C. H. *et al.*, 2022), SYBR green (LI PENG *et al.*, 2022) e ponceau S (CORREIA, B. P. *et al.*, 2022). Como também a ninidrina e o 4-aminofenol, os quais foram comprovados neste estudo suas atividades eletroativas e as suas interações com o DNA.

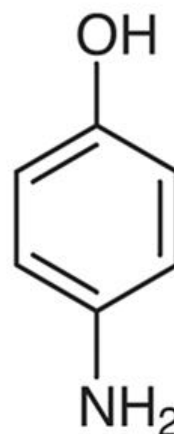
A ninidrina (1,2,3-Triketohydrindene monohydrate, NHN), apresentada na Figura 11, é uma molécula muito conhecida e comumente utilizada para análise de aminoácidos devido à sua interação com grupos amino em proteínas e peptídeos (JEONG, S. *et al.*, 2023). Além disso, foi descrito que a ninidrina reage com ácidos nucleicos (CARLIN, M. *et al.*, 2023) e modifica o RNA em sistemas CRISPR (WANG, S. *et al.*, 2020). Contudo, a aplicação da ninidrina como um indicador de hibridização eletroativo aplicado à elaboração de um genossensor ainda é pouco estudado (GUEDES, P. H. G. *et al.*, 2021).

Desse modo, as reações químicas da ninidrina têm grande impacto em trabalhos biológicos, análises bioanalíticas e em exames forenses. De maneira que é possível identificar grupos aminos de forma rápida e sensível, como por exemplo a ninidrina é

utilizada para identificar impressões digitais latentes em investigações forenses (MADISON, C. *et al.*, 2023). De acordo com Ajaya *et al.*, (2022), a reação da ninidrina com o aminoácido emitirá a cor roxa de Ruhemann (púrpura) (AJAYA *et al.*, 2022). Em contrapartida, os estudos envolvendo a ninidrina são complexos, pois dependem de vários componentes de reação, como meio de reação, temperatura e reagentes. Em tais trabalhos acadêmicos, a sensibilidade e a estabilidade da ninidrina foram aumentadas, de tal modo que afetou os estudos atuais, ampliando o potencial de aplicação dessa molécula (AJAYA *et al.*, 2022).



Ninidrina



4-aminofenol

Figura 11 - Representação dos compostos utilizados como indicadores de hibridização de ácidos nucleicos, a ninidrina e o 4-aminofenol.

Os aminofenóis são compostos químicos promissores em estudos eletroquímicos, uma vez que eles apresentam dois grupos substituintes diferentes no anel aromático, os quais são eletroquimicamente ativos como observado na figura 11, esses grupos consistem em grupamento amino e hidroxila ($-NH_2$ e $-OH$), portanto, apresentam comportamento eletroquímico semelhante aos de polímeros condutores, por exemplo a anilina (CASTRO, A. C. H. *et al.*, 2022). Especificamente o 4-aminofenol (4-AMF), comumente é utilizado como monômero ou como polímero na superfície do eletrodo modificando-a de forma que esse composto melhora a resposta eletroquímica de um

biossensor (CASTRO, A. C. H. *et al.*, 2022). Entretanto, o 4-AMF ainda não foi aplicado como indicador de hibridização de DNA para o desenvolvimento de um genossensor eletroquímico para detecção de fungos patogênicos, cujo presente estudo propõe. Ademais, o 4-AMF é um intermediário químico orgânico amplamente utilizado, tem sido difusamente aplicado em corantes, remédios, reveladores, antioxidante e aditivo de petróleo, além disso, apresenta-se como material importante da síntese do paracetamol (KARIMI-MALEH *et al.*, 2023). A aplicação do 4-AMF na ciência está presente em espectro UV (ZHANG, Y. *et al.*, 2022), cromatografia líquida (MOUSAZADEH, H.; SEYYED, A. 2020), cromatografia gasosa (ZHANG *et al.*, 2022) e método eletroquímico (CASTRO, A. C. H. *et al.*, 2022).

Portanto, nesse estudo foi desenvolvido dois genossensores eletroquímicos para a detecção dos ácidos nucleicos dos fungos patogênicos *C. auris* e *T. rubrum* por meio da imobilização dos oligonucleotídeos em eletrodos de ouro, utilizando a detecção indireta com novos indicadores de hibridização de DNA como a ninidrina e 4-AMF. A Figura 12 representa esquematicamente os genossensores desenvolvidos. De modo que tanto a ninidrina quanto o 4-AMF apresentam em sua estrutura grupamento aminos, os quais possuem alta afinidade pelo DNA (GUEDES, P. H. G. *et al.*, 2021).

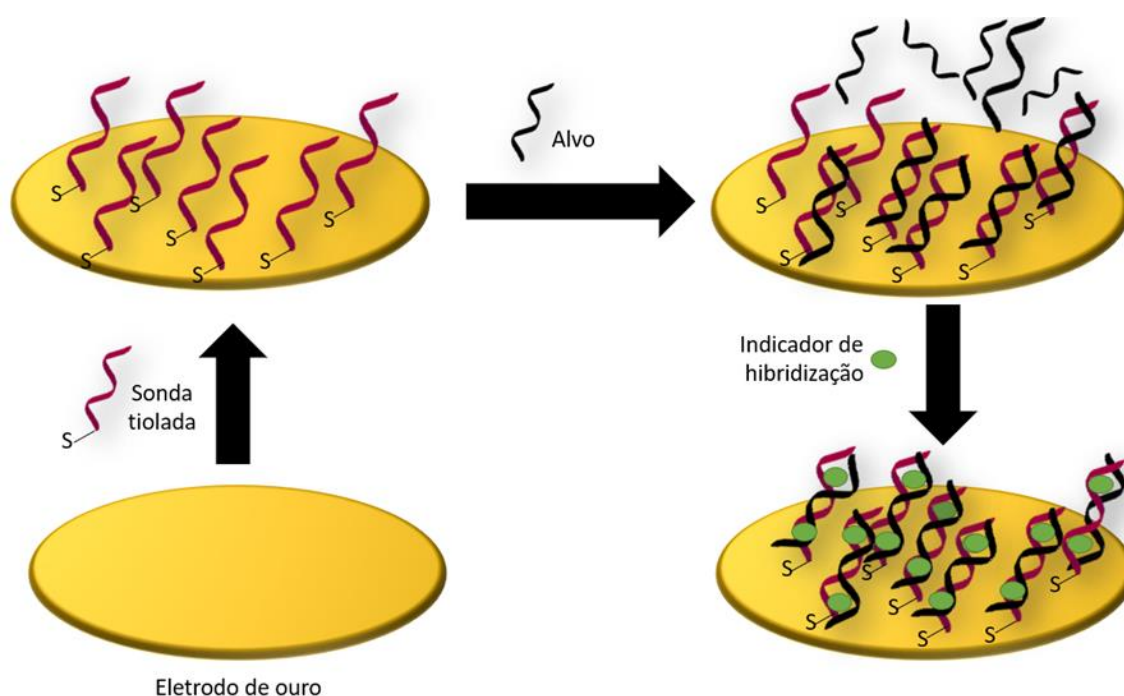


Figura 12 - Esquema do genossensor construído neste estudo. Foi usado eletrodo de ouro como superfície de imobilização, onde foi imobilizado sonda de DNA com grupo tiol (sonda

tiolada). Em seguida é adicionado o alvo complementar (o sistema foi transferido para uma estufa seca a 55° C por 10 min). Por fim, o indicador de hibridização (ninidrina ou 4-AMF) foi adicionado no sistema (fonte: autoria própria).

5. Referências

AJAYA BHATTARAI; MALIK ABDUL RUB; MIHALJ POSA; BIDYUT SAHA; ABDULLAH M. ASIRI; DILEEP KUMAR. Studies of ninhydrin and phenylalanine in cationic dimeric gemini micellar system: Spectrophotometric and conductometric measurements. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 655, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2022.130334>.

ALMEIDA, JOÃO N.; JR.; ELAINE C. FRANCISCO; FERRY HAGEN; IGOR B. BRANDÃO; FELICIDADE M. PEREIRA; PEDRO H. PRESTA DIAS; MAGDA M. DE MIRANDA COSTA; REGIANE T. DE SOUZA JORDÃO; THEUN DE GROOT; ARNALDO L. COLOMBO. Emergence of *Candida auris* in Brazil in a COVID-19 Intensive Care Unit. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 3, p: 220, 2021. <https://doi.org/10.3390/jof7030220>

ARIFFIN, ZAIDAH ZAINAL, MUHAMMAD NAZIZ SAAT, AND NURUL TASHA ZULKIFLE. A review on response surface methodology optimization in microbial biotransformation. **Science Letters**, v. 16, no. 2, p. 64-72, 2022. <https://ir.uitm.edu.my/id/eprint/63182>

BAZZICALUPO A. Local adaptation in fungi. **FEMS Microbiol Rev.**, v. 46, n.6, 2022. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuac026>.

BRAVO RUIZ G, LORENZ A. What do we know about the biology of the emerging fungal pathogen of humans *Candida auris*? **Microbiol Res**, v. 242, p: 126621, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126621>

BRETT, CHRISTOPHER MA. Electrochemical impedance spectroscopy in the characterisation and application of modified electrodes for electrochemical sensors and biosensors. **Molecules**, v. 27, n. 5, p: 1497, 2022. <https://doi.org/10.3390/molecules27051497>

MADISON, C. *et al.* Quantifying DNA Loss in Laboratory-Created Latent Prints Due to Fingerprint Processing. **Forensic Science International**, p: 111595, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2023.111595>

- CASADEVALL A. Immunity to Invasive Fungal Diseases. **Annu Rev Immunol**, v. 40, p: 121-141, 2022. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-101220-034306>.
- CASADEVALL A.; KONTOYIANNIS D.P.; ROBERT V. On the emergence of *Candida auris*: Climate change, azoles, swamps, and birds. **mBio**, v. 10, p: e01397-e01319, 2019. <https://doi.org/10.1128/mbio.01397-19>
- CASTRO, A.C.H.; KOCHI, L.T.; FLAUZINO, J.M.R. *et al.* Electrochemical Biosensor for Sensitive Detection of Hepatitis B in Human Plasma. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 194, p: 2604–2619, 2022. <https://doi.org/10.1007/s12010-022-03829-4>
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC) *CANDIDA AURIS: General information about Candida auris*. 2021. Acessado em 27 fevereiro 2022. Disponível em: <https://www.cdc.gov/fungal/candida-auris/candida-auris-qanda.html>.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC): *Tracking Candida auris*. 2022. Acessado em 12 dezembro 2022. Disponível em: <https://www.cdc.gov/fungal/candida-auris/tracking-c-auris.html>
- CHAUDHARY, VISHAL. A paradigm of internet-of-nano-things inspired intelligent plant pathogen-diagnostic biosensors. **ECS Sensors Plus**, v. 1, n. 3, 2022. <https://doi.org/10.1149/2754-2726/ac92ed>
- CHENG T.; ZHANG W.; YANG. Applications of metal-organic framework (MOF)-based sensors for food safety: Enhancing mechanisms and recent advances. **Trends in Food Science & Technology**, v.112, p: 268-282, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.04.004>
- CHOW N.A.; GADE L.; TSAY S.V.; FORSBERG K.; GREENKO J.A.; SOUTHWICK K.L.; BARRETT P.M.; KERINS J.L.; LOCKHART S.R.; CHILLER T.M.; LITVINTSEVA A.P. Multiple introductions and subsequent transmission of multidrug-resistant *Candida auris* in the USA: a molecular epidemiological survey. **Lancet Infect Dis**, v. 18, p: 1377–1384, 2018. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(18\)30597-8](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(18)30597-8)
- CHOWDHARY, A.; TARAI, B.; SINGH, A.; SHARMA, A. Multidrug-Resistant *Candida auris* Infections in Critically Ill Coronavirus Disease Patients. **Emerg. Infect. Dis**, v. 26, p: 2694-2686, **2020**. <https://doi.org/10.3201/eid2611.203504>

CHOWDHARY, ANURADHA, ASHUTOSH SINGH, AMTOJ KAUR, AND ANANTA KHURANA. The emergence and worldwide spread of the species *Trichophyton indotineae* causing difficult-to-treat dermatophytosis: A new challenge in the management of dermatophytosis. **PLoS Pathogens**, v. 18, n. 9, 2022.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010795>

CLARK, L. C., JR.; LYONS, C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 102, p. 29-45, 1962. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1962.tb13623.x>

COLWELL, MATHIA L.; COURTNEY TOWNSEL; REBEKAH L. PETROFF; JACLYN M. GOODRICH; DANA C. DOLINOY. Epigenetics and the exposome: DNA methylation as a proxy for health impacts of prenatal environmental exposures. **Exposome**, 2023.

<https://doi.org/10.1093/exposome/osad001>

CONNIE CAÑETE-GIBAS; NATHAN P. WIEDERHOLD. Mycology of *Onychomycosis*. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 45, n. 2, Pages 11-17, 2023.

<https://doi.org/10.1016/j.clinmicnews.2023.01.002>

CORREIA, B.P.; SOUSA, M.P.; SOUSA, C.E.A. *et al.* Development of colorimetric cellulose-based test-strip for the rapid detection of antibodies against SARS-CoV2 virus. **Cellulose**, v. 29, p: 9311–9322, 2022. <https://doi.org/10.1007/s10570-022-04808-y>

CRUZ, R.; WUEST. Beyond ergosterol: Strategies for combatting antifungal resistance in *Aspergillus fumigatus* and *Candida auris*. **Tetrahedron**, 2023.

<https://doi.org/10.1016/j.tet.2023.133268>

DENNING D.W. Antifungal drug resistance: an update. **Eur J Hosp Pharm**, v. 2, p: 109-112, 2022. <https://doi.org/10.1136/ejhpharm-2020-002604>

DONG; XIAOZE; SHUO QI; IMRAN MAHMOOD KHAN; YUHAN SUN; YIN ZHANG; ZHOUPING WANG. Advances in riboswitch-based biosensor as food samples detection tool. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 22, n. 1, p: 451-472, 2023. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.13077>

DU H.; BING J.; HU T.; ENNIS C.L.; NOBILE C.J.; HUANG G. *Candida auris*: Epidemiology, biology, antifungal resistance, and virulence. **PLoS Pathog**, v. 16, 2020.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008921>

EKENG, BASSEY E.; WINNIE KIBONE; ASA E. ITAM-EYO; FELIX BONGOMIN.

Onychomycosis in Patients with Diabetes Mellitus in Africa: A Global Scoping Review, 2000–2021. **Mycopathologia**, p:1-10, 2022. <https://doi.org/10.1007/s11046-022-00660-7>

EKSIN, ECE; ERDEM, ARZUM. Recent Progress on Optical Biosensors Developed for Nucleic Acid Detection Related to Infectious Viral Diseases. **Micromachines**, v. 14, n. 2, p: 295, 2023. <https://doi.org/10.3390/mi14020295>

EUN RYUNG KIM; CHEULMIN JOE; ROBERT J. MITCHELL; MAN BOCK GU.

Biosensors for healthcare: current and future perspectives. **Trends in Biotechnology**, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2022.12.005>.

FAN, G. *et al.* Antifungal Efficacy of Gallic Acid Extracted from Pomegranate Peel Against *Trichophyton rubrum*: In Vitro Case Study. **Natural Product Communications**, v. 18, n. 1, p. 1934578-221148607, 2023. <https://doi.org/10.1177/1934578X221148607>

FASCIANA T.; CORTEGIANI A.; IPPOLITO M.; GIARRATANO A.; DI QUATTRO O.; LIPARI D.; GRACEFFA D.; GIAMMANCO A. *Candida auris*: An overview of how to screen, detect, test and control this emerging pathogen. **Antibiotics (Basel)**, v. 9, p. 778, 2020. <https://doi.org/10.3390%2Fantibiotics9110778>

FORSBERG K.; WOODWORTH K.; WALTERS M.; BERKOW E.L.; JACKSON B.; CHILLER T.; VALLABHANENI S. *Candida auris*: The recent emergence of a multidrug-resistant fungal pathogen. **Med Mycol**, v. 57, p. 1-12, 2019. <https://doi.org/10.1093/mmy/myy054>

FUKU, XOLILE; BILIBANA, MAWETHU P.; IWUOHA, EMMANUEL. Genosensor design and strategies towards electrochemical deoxyribonucleic acid (DNA) signal transduction: Mechanism of interaction. **Journal of Molecular Structure**, p. 133810, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2022.133810>

GARCIA-MELO; LUIS FERNANDO *et al.* Detection of the p53 Gene Mutation Using an Ultra-sensitive and Highly Selective Electrochemical DNA Biosensor. **Journal of the Mexican Chemical Society**, v. 67, n. 1, p. 33-45, 2023. <https://doi.org/10.29356/jmcs.v67i1.1880>

GUEDES P.H.G.; BRUSSASCO J.G.; MOÇO A.C.R.; MORAES D.D.; FLAUZINO J.M.R.; LUZ L.F.G.; ALMEIDA M.T.G.; SOARES M.M.C.N.; OLIVEIRA R.J.; MADURRO J.M.; BRITO-MADURRO A.G. Ninhydrin as a novel DNA hybridization indicator applied to a highly reusable electrochemical genosensor for *Candida auris*. **Talanta**, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122694>.

GUPTA, A. K.; COOPER. Update in antifungal therapy of dermatophytosis. *Mycopathologia*, v. 166, p. 353–367, 2008. <https://doi.org/10.1007/s11046-008-9109-0>

HAO, J. *et al.* A novel signal amplification strategy for label-free electrochemical DNA sensor based on the interaction between α -cyclodextrin and ferrocenyl indicator. **Bioelectrochemistry**, p. 108373, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2023.108373>

HOU X., LEE A., JIMÉNEZ-ORTIGOSA C., KORDALEWSKA M., PERLIN D.S., ZHAO Y. Rapid detection of ERG11-associated azole resistance and FKS-associated echinocandin resistance in *Candida auris*. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 63, p. 01811-18, 2018. <https://doi.org/10.1128/AAC.01811-18>.

CHISHOLM-BURNS MA, SCHWINGHAMMER TL, MALONE PM, KOLESAR JM, LEE KC, BOOKSTAVAR P. **Pharmacotherapy Principles and Practice**, 5 edição. 2018. Acessado em 28 de fevereiro 2023. Disponível em: <https://ppp.mhmedical.com/content.aspx?bookid=2440§ionid=193848502>

HUA, YU *et al.* DNA-based biosensors for the biochemical analysis: a review. **Biosensors**, v. 12, n. 3, p. 183, 2022. <https://doi.org/10.3390/bios12030183>

IUPAC. **Compendium of Chemical Terminology**, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997). Online version (2019-) created by S. J. Chalk. <https://doi.org/10.1351/goldbook>.

JACOBS, E., JONATHAN L. JACOBS, EMILY K. DENNIS, SARAH TAIMUR, MEENAKSHI RANA, DHRUV PATEL, MELISSA GITMAN *et al.* *Candida auris* pan-drug-resistant to four classes of antifungal agents. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 66, n. 7, 2022. <https://doi.org/10.1128/aac.00053-22>

JAIN, UTKARSH; CHAUHAN, NIDHI; SAXENA, KIRTI. Fundamentals of sensors and

biosensors: An overview. **Multifaceted Bio-Sensing Technology**, p: 31-44, 2023.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90807-8.00005-1>

JENKS, J. D., CORNELLY, O. A., CHEN, S. C., THOMPSON, G. R., & HOENIGL, M. (2020). *Breakthrough Invasive Fungal Infections: Who is at risk?* **Mycoses**, 2020.
<https://doi.org/10.1111/myc.13148>

JENKS, JEFFREY D.; CHIOMA INYANG ANEKE; MOHANAD M. AL-OBAIDI; MATTHIAS EGGER; LORENA GARCIA; TOMMI GAINES; MARTIN HOENIGL; GEORGE R. THOMPSON III. Race and ethnicity: Risk factors for fungal infections? **PLoS pathogens**, v. 19, n. 1, 2023. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011025>

JEONG, SUHUI *et al.* Ninhydrin Loaded Microcapsules for Detection of Natural Free Amino Acid. **Chemosensors**, v. 11, n. 1, p. 49, 2023.
<https://doi.org/10.3390/chemosensors11010049>

KARIMI-MALEH, HASSAN *et al.* State-of-art advances on removal, degradation and electrochemical monitoring of 4-aminophenol pollutants in real samples: A review. **Environmental Research**, p. 115338, 2023.
<https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.115338>

KAUR, HARDEEP *et al.* Assessment of Diabetes Biomarker Monitoring via Novel Biosensor Activity. **Results in Chemistry**, p. 100777, 2023.
<https://doi.org/10.1016/j.rechem.2023.100777>

KIBBLER, CHRISTOPHER C. AND OTHERS (EDS), EPIDEMIOLOGY OF FUNGAL DISEASE in CHRISTOPHER C. KIBBLER *et al.* **Oxford Textbook of Medical Mycology**, 2018. <https://doi.org/10.1093/med/9780198755388.003.0007>.

KÜÇÜK; NETICE; SAMET ŞAHİN; MUSTAFA OĞUZHAN ÇAĞLAYAN. An Overview of Biosensors for the Detection of Patulin Focusing on Aptamer-Based Strategies. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, p: 1-13, 2023.
<https://doi.org/10.1080/10408347.2023.2172677>

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; HEINS-VACCARI, E.M. & TAKAHASHI DE MELO, N. **Tratado de Micologia médica**; Prefácio: Bertrand Dupont. 9. Edição. São Paulo, Sarvier, 2002. ISBN 85-7378-123-8.

LI PENG; JIAN ZHU; BIN YANG; HUIMIN HAO; SHUYAN LOU. A green photocatalytic-biosensor for colorimetric detection of pesticide (carbaryl) based on inhibition of acetylcholinesterase. **Talanta**, v. 246, 2022.

<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.123525>.

LIU, JINGJING, YIFEI XU, SHIKUN LIU, SHIXIN YU, ZHIRUN YU; SZE SHIN LOW. Application and progress of chemometrics in voltammetric biosensing. **Biosensors**, v. 12, n. 7, p: 494, 2022. <https://doi.org/10.3390/bios12070494>

LIU-NA WEI; LIN LUO; BING-ZHI WANG; HONG-TAO LEI; TIAN GUAN; YU-DONG SHEN; HONG WANG; ZHEN-LIN XU. Biosensors for detection of paralytic shellfish toxins: Recognition elements and transduction technologies. **Trends in Food Science & Technology**, v. 133, p: 205-218, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2023.02.012>.

LOGAN, A.; WOLFE, A.; WILLIAMSON, J.C. Antifungal Resistance and the Role of New Therapeutic Agents. **Curr Infect Dis Rep**, v. 24, p: 105–116, 2022.

<https://doi.org/10.1007/s11908-022-00782-5>

LOPES J.P.; LIONAKIS M.S. Pathogenesis and virulence of *Candida albicans*. **Virulence**, v. 13, p:89-121, 2022. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.2019950>.

LV; DIYA; JIN XU; MINYU QI; DONGYAO WANG; WEIHENG XU; LEI QIU; YINGHUA LI; YAN CAO. A strategy of screening and binding analysis of bioactive components from traditional Chinese medicine based on surface plasmon resonance biosensor. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 12, n. 3, p:500-508, 2022.

<https://doi.org/10.1016/j.jpha.2021.11.006>

MA X; GAO M.; VISCHER H.F.; LEURS R. A NanoBRET-Based H3R Conformational Biosensor to Study Real-Time H3 Receptor Pharmacology in Cell Membranes and Living Cells. **Int J Mol Sci**, v. 23, n. 15, p: 8211, 2022. <https://doi.org/10.3390/ijms23158211>

MADARASINGHA, NAYANI P., SURAMMIKA ERIYAGAMA, PRIMALI I. JAYASEKERA, SHREENIKA DE SILVA WELIANGE, SAMAN GUNASEKERA, D. M. MUNASINGHA, PREMINI RAJENDRAN *et al.* Characterization of Recalcitrant Dermatophytosis in a Multicenter Study in Sri Lanka. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 107, no. 1, p.117-121, 2022. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.21-1022>

MANRING, NOEL; MUZAMMIL MN AHMED; NICHOLAS TENHOFF; JESSICA L. SMELTZ; PAVITHRA PATHIRATHNA. Recent advances in electrochemical tools for virus detection. **Analytical Chemistry**, v. 94, n. 20, p: 7149-7157, 2022.

<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c05358>

MCNAUGHT, A. D.; WILKINSON, A. IUPAC. **Compendium of Chemical Terminology**. 2 edição. Blackwell Scientific Publications, 1997.

<https://goldbook.iupac.org/#:~:text=9%2D8%0ADOI%3A-,10.1351/goldbook,-Stuart%20Chalk%20%2D%20Technical>

MEHRANNIA, LEILA; BALAL KHALILZADEH; REZA RAHBARGHAZI; MORTEZA MILANI; GULSAH SAYDAN KANBEROGLU; HADI YOUSEFI; NEVIN ERK.

Electrochemical Biosensors as a Novel Platform in the Identification of Listeriosis Infection. **Biosensors**, v. 13, n. 2, p: 216, 2023. <https://doi.org/10.3390/bios13020216>

MOHAMMADPOUR-HARATBAR, ALI; SEYYED BEHNAM ABDOLLAHI BORAEI; YASSER ZARE; KYONG YOP RHEE; AND SOO-JIN PARK. Graphene-Based Electrochemical Biosensors for Breast Cancer Detection. **Biosensors**, v. 13, n. 1, p: 80, 2023. <https://doi.org/10.3390/bios13010080>

MOHAMMAD-RAZDARI A.; GHASEMI-VARNAMKHAHI M.; ROSTAMI S.; IZADI Z.; ENSAFI A.A.; SIADAT M. Development of an electrochemical biosensor for impedimetric detection of tetracycline in milk. **J Food Sci Technol**, v.57, n. 12, p:4697-4706, 2020. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04506-2>.

MORAES, DANIEL CLEMENTE. Current scenario of the search for new antifungal agents to treat Candida auris infections: An integrative review. **Journal of Medical Mycology**, 32, no. 1, p: 101232, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2021.101232>

MOUSAZADEH HASSANI; SEYYED ALIREZA. Simultaneous determination of active ingredients in multicomponent common over the counter tablets in the presence of parabens and 4-aminophenol by HPLC. **Chromatographia**, v. 83, n. 7, p: 791-805, 2020. <https://doi.org/10.1007/s10337-020-03886-z>

NAVARRO-PÉREZ D.; TARDÁGUILA-GARCÍA A.; GARCÍA-OREJA S.; LÓPEZ-MORAL M.; GARCÍA-MADRID M.; LÁZARO-MARTÍNEZ J.L. Onychomycosis associated with

diabetic foot syndrome: A systematic review. **Mycoses**, 2023.

<https://doi.org/10.1111/wrr.12717>

NobelPrize.org. Nobel Prize Outreach AB 2023. Jaroslav Heyrovsky – Facts. Acesso em: 17 fevereiro 2023. Disponível em:

<<https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1959/heyrovsky/facts/>>

NORIMATSU, YUTA; YURIE NORIMATSU. A severe case of *Trichophyton rubrum*-caused dermatomycosis exacerbated after COVID-19 vaccination that had to be differentiated from pustular psoriasis. **Medical Mycology Case Reports**, v.36, p: 19-22, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.mmcr.2022.03.001>

OH; HYUNAH EUSTINA; SAMANTHA EATHORNE; MATTHEW A. JONES. Use of biosensor technology in analysing milk and dairy components: A review. **International Journal of Dairy Technology** 75, n. 4, p:738-748, 2022. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12900>

ÖZSOYLU; DUA; TORSTEN WAGNER; AND MICHAEL J. SCHÖNING. Electrochemical cell-based biosensors for biomedical applications. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 9, p: 713-733, 2022.

PERES, N. T.; P. R. SANCHES, J. P.; FALCAO, H. C.; SILVEIRA, F. G.; PAIAO, F. C.; MARANHÃO, D. E.; GRAS, F.; SEGATO, R. A.; CAZZANIGA, M.; MAZUCATO, J. R.; CURSINO-SANTOS, R.; QUINO-FERREIRA, A.; ROSSI; MARTINEZ-ROSSI.

Transcriptional profiling reveals the expression of novel genes in response to various stimuli in the human dermatophyte *Trichophyton rubrum*. **BMC Microbiol**, v. 10, n. 39, 2010. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-39>

PEIXOTO; MAQUINE G.; FRANCESCONI V. A.; FRANCESCONI F. Dermatofitose por *Trichophyton rubrum* com infecção oportunista em pacientes com doença de Cushing. **Ana. Bras. Dermatol.**, v. 85, n. 6, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0365-05962010000600017>

POHANKA, MIROSLAV. Electrochemical Hand-Held Biosensors for Biological Warfare Agents Assay. **Int. J. Electrochem. Sci** 17, v. 2, n. 220961, 2022. <https://doi.org/10.20964/2022.09.58>

RAMESH, MANICKAM *et al.* Nanotechnology-Enabled Biosensors: A Review of Fundamentals, Design Principles, Materials, and Applications. **Biosensors**, v. 13, n. 1, p. 40, 2023. <https://doi.org/10.3390/bios13010040>

RANA; MUHIT; TUGBA YILMAZ; SHIRLI COHEN; SINEM BEYHAN; AVNI A. ARGUN. A novel biosensor for ultrasensitive detection of fungal genes. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 222, p: 114986, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2022.114986>

RICHTEL, M. How a Chicago woman fell victim to *Candida Auris*, a drug resistant fungus. The New York Times. Nova York, 19 de julho 2019. Acesso em: 12 de fevereiro 2023. Disponível em: <https://www.nytimes.com/2019/04/17/health/candida-auris-fungus-chicago.html>.

RUI KANO; HIROMITSU NOGUCHI; MASATARO HIRUMA, A deletion mutation in the amino acid sequence of squalene epoxidase in terbinafine-resistant *Trichophyton rubrum*. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 28, n. 6, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2022.02.010>.

RUIZ-GAITÁN A.; MORET A.M.; TASIAS-PITARCH M.; ALEIXANDRE-LOPEZ A.I.; MARTÍNEZ-MOREL H.; CALABUIG E.; SALAVERT-LLETÍ M.; RAMIREZ P.; HONTANGAS J.L.L.; HAGEN F. *et al.* An outbreak due to *Candida auris* with prolonged colonisation and candidaemia in a tertiary care European hospital. **Mycoses**, v. 61, p: 498–505, 2018. <https://doi.org/10.1111/myc.12781>.

RYBAK, J. M.; CUOMO, C. A.; ROGERS, P. D. The molecular and genetic basis of antifungal resistance in the emerging fungal pathogen *Candida auris*. **Current Opinion in Microbiology**, v.70, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2022.102208>

SAFI-SAMGHABADI, A.; ATYABI, S.M.; RAZZAGHI-ABYANEH, M. Anti-dermatophytic activity of cold atmospheric plasma against *Trichophyton rubrum* via affecting fungal growth, morphology, drug susceptibility and *HSP90* gene expression. **Sci Rep**, v. 12, p: 9481, 2022. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-13828-4>

SANYAOLU A, OKORIE C, MARINKOVIC A, ABBASI AF, PRAKASH S, MANGAT J, HOSEIN Z, HAIDER N, CHAN J. *Candida auris*: An Overview of the Emerging Drug-Resistant Fungal Infection. **Infect Chemother**, v. 54, n. 2, p:236-246, 2022.

<https://doi.org/10.3947/ic.2022.0008>.

SHALANNANDA; WERVYAN; ARDIANTO SATRIAWAN; MUHAMMAD FAIRUZI KO NURRAJAB; ANCHELMIA CHYNTIA HANNA AYULESTARI; DIAH AYU SAFITRI; FINNA ALIVIA NABILA; CASI SETIANINGSIH; ISA ANSHORI. Biosensors for therapeutic drug monitoring: a review. **F1000Research**, v. 12, n. 171, p: 171, 2023.

<https://doi.org/10.12688/f1000research.130863.1>

SHANNON KILBURN; GABRIEL INNES; MONICA QUINN; KAREN SOUTHWICK; BELINDA OSTROWSKY; JANE A. GREENKO; EMILY LUTTERLOH; REBECCA GREELEY; Reed Magleby; Vishnu Chaturvedi; Sudha Chaturvedi. Antifungal Resistance Trends of *Candida auris* Clinical Isolates in New York and New Jersey from 2016 to 2020. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 66, n. 3, 2022. <https://orcid.org/0000-0002-3922-9676>

SINGH; ANOOP; ASHA SHARMA; AAMIR AHMED; ASHOK K. SUNDRAMOORTHY; HIDEMITSU FURUKAWA; SANDEEP ARYA; AJIT KHOSLA. Recent Advances in Electrochemical Biosensors: Applications, Challenges, and Future Scope. **Biosensors**, v. 11, n. 9, p: 336, 2021. <https://doi.org/10.3390/bios11090336>

SU, H., LI, L., CHENG, B. *et al.* *Trichophyton rubrum* Infection Characterized by Majocchi's Granuloma and Deeper Dermatophytosis: Case Report and Review of Published Literature. **Mycopathologia**, v. 182, p: 549–554, 2017. <https://doi.org/10.1007/s11046-016-0099-z>

TAMIYA, EIICHI. Portable electrochemical DNA sensors based on gene amplification reactions to screen and identify pathogen and SNPs. **Sensors**, v. 22, n. 5, 2022. <https://doi.org/10.3390/s22051865>

TREADWELL; GOWDA, A.; MCKERNAN; CARLSON. Fungus Among Us? The Association Between Fungal Dermatophytes and Allergic Hypersensitivity Reactions. **Annals of Allergy, Asthma & Immunology**, v. 129, n. 5, p: S22, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.anai.2022.08.567>

VASEGHI; NARGES; JOOBIN SHARIFISOORAKI; HOSSEIN KHODADADI; SANAM NAMI; FATEMEH SAFARI; FATEMEH AHANGARKANI; JACQUES F. MEIS; HAMID

BADALI; HAMID MOROVATI. Global prevalence and subgroup analyses of Coronavirus disease (COVID-19) associated *Candida auris* infections (CACa): A systematic review and meta-analysis. **Mycoses**, v. 65, n. 7, p: 683-703, 2022.

<https://doi.org/10.1111/myc.13471>

VINAYAGAMOORTHY K.; PENTAPATI K.C.; PRAKASH H. Prevalence, risk factors, treatment and outcome of multidrug resistance *Candida auris* infections in Coronavirus disease (COVID-19) patients: A systematic review. **Mycoses**, v. 65, n. 6, p: 613-624, 2022. <https://doi.org/10.1111/myc.13447>.

WANG, SHAO-RU *et al.* The Manipulation of RNA-Guided Nucleic Acid Cleavage with Ninhydrin Chemistry. **Advanced Science**, v. 7, n. 13, p: 1903770, 2020.

<https://doi.org/10.1002/adv.201903770>

WANG; GAOFENG; ZHEN LIN; YUE LI; LU CHEN; SASHANK K. REDDY; ZHIQI HU; LUIS GARZA. Colonizing microbiota is associated with clinical outcomes in diabetic wound healing. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2023.114727>

WANG; JINGTING; CHONG DONG; QIQUAN LI; XU YANG; DAPING LI; LIXIA ZHANG; YIFENG ZHANG; GUOQIANG ZHAN. Innovative electrochemical biosensor with nitrifying biofilm and nitrite oxidation signal for comprehensive toxicity detection in Tuojiang River. **Water Research**, v. 119757, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2023.119757>

WHITTINGHAM; MATTHEW J.; ROBERT D. CRAPNELL; EMMA J. ROTHWELL; NICHOLAS J. HURST; CRAIG E. BANKS. Additive manufacturing for electrochemical labs: An overview and tutorial note on the production of cells, electrodes and accessories. **Talanta**, v. 4, p: 100051, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.talo.2021.100051>

WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action. Geneva: **World Health Organization**; 2022. Acesso em 09 de fevereiro 2023. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240060241>

ZAMITH-MIRANDA D., HEYMAN H.M., CLEARE L.G., COUVILLION S.P., CLAIR G.C., BREDEWEG E.L., GACSER A., NIMRICHTER L., NAKAYASU E.S.; NOSANCHUK J.D. Multi-omics Signature of *Candida auris*, an emerging and multidrug-resistant pathogen.

mSystems. v. 4, 2019. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00257-19>

ZHANG R.; ZHAO J.; LI L. Metabolic phenotype analysis of *Trichophyton rubrum* after laser irradiation. **BMC Microbiol**, v. 23, p: 24, 2023. <https://doi.org/10.1186/s12866-023-02759-3>

ZHANG, XINDAN *et al.* Application of Polypyrrole-Based Electrochemical Biosensor for the Early Diagnosis of Colorectal Cancer. **Nanomaterials**, v. 13, n. 4, p. 674, 2023. <https://doi.org/10.3390/nano13040674>

ZHANG, YIBO *et al.* In-situ synthesis of metal-organic framework embedded in ordered mesoporous silica functionalized with carboxyl groups for 4-nitrophenol to 4-aminophenol. **Applied Surface Science**, v. 597, p. 153720, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2022.153720>

ZHANG; RUINA; JUNYING ZHAO; LINFENG LI. Metabolic phenotype analysis of *Trichophyton rubrum* after laser irradiation. **BMC Microbiology**, v. 23, n. 1, p: 1-9, 2023. <https://doi.org/10.1186/s12866-023-02759-3>

ZHENG; SIMENG; QIAN YANG; HAOYU YANG; YUNZHE ZHANG; WEI GUO; AND WEI ZHANG. An ultrasensitive and specific ratiometric electrochemical biosensor based on SRCA-CRISPR/Cas12a system for detection of Salmonella in food. **Food Control**, v. 146, p: 109528, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109528>

ZHU, QINGLIN, YUEMENG YANG, HONGXIAO GAO, LI-PING XU, AND SHUTAO WANG. Bioinspired superwetable electrodes towards electrochemical biosensing. **Chemical Science**, 2022. <https://doi.org/10.1039/D2SC00614F>

**Capítulo 2 – *NINHYDRIN AS A NOVEL DNA HYBRIDIZATION INDICATOR
APPLIED TO A HIGHLY REUSABLE ELECTROCHEMICAL
GENOSENSOR FOR CANDIDA AURIS***

Capítulo 2 - artigo publicado em destaque na capa do periódico *Talanta*
(disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122694>)

Resumo

Este trabalho relata uma estratégia simples para detecção de DNA genômico (gDNA) de *Candida auris* (*C. auris*), um fungo multirresistente associado a surtos nosocomiais em ambientes de saúde, apresentando altas taxas de mortalidade e morbidade. A plataforma foi desenvolvida usando eletrodo de ouro sensibilizado com sonda específica de DNA e ninidrina como um novo indicador de hibridização de DNA. O genossensor foi capaz de detectar *C. auris* em amostra de urina por voltametria de pulso diferencial e espectroscopia de impedância eletroquímica. O desempenho analítico do biossensor foi analisado, detectando até $4,5 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$ de gDNA de *C. auris* na urina (1:10, V/V). Além disso, o genossensor foi reutilizado oito vezes sem perda na resposta do sinal de corrente. O genossensor apresentou seletividade e estabilidade, mantendo 100% de sua resposta até 80 dias de armazenamento. Para analisar interações de DNA de fita simples e dupla com ninidrina, SEM, AFM e estudos de dinâmica molecular seguidos de simulações computacionais foram realizadas. Cálculos teóricos mostraram interações de ninidrina mais favoravelmente com dsDNA em sulcos ricos em A-T do que em ssDNA. Assim, o sistema proposto é um dispositivo de detecção eletroquímica promissor para uma detecção mais precisa de *C. auris* gDNA em amostras biológicas.

Palavras-chave: *Candida auris*, fungos patogênicos, diagnóstico point-of-care, genossensor eletroquímico, ninidrina.



Ninhydrin as a novel DNA hybridization indicator applied to a highly reusable electrochemical genosensor for *Candida auris*

Pedro H.G. Guedes^a, Jéssica G. Brussasco^a, Anna C.R. Moço^a, Dayane D. Moraes^a, José M. R. Flauzino^a, Luiz F.G. Luz^b, Margarete T.G. Almeida^c, Márcia M.C.N. Soares^d, Ronaldo J. Oliveira^e, João M. Madurro^b, Ana G. Brito-Madurro^{a,*}

^a Institute of Biotechnology, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, Brazil

^b Institute of Chemistry, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, Brazil

^c Faculty of Medicine of São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, Brazil

^d Adolfo Lutz Institute, Regional Laboratory in São José do Rio Preto, Brazil

^e Department of Physics, Institute of Exact, Natural Sciences and Education, Federal University of Triângulo Mineiro, Uberaba, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Candida auris

Fungal pathogens

Diagnosis

Point of care

Electrochemical genosensor

Ninhydrin

ABSTRACT

This work reports a simple strategy for *Candida auris* genomic DNA (gDNA) detection, a multi-resistant fungus associated with nosocomial outbreaks in healthcare settings, presenting high mortality and morbidity rates. The platform was developed using gold electrode sensitized with specific DNA capture probe and ninhydrin as a novel DNA hybridization indicator. The genosensor was able to detect *C. auris* in urine sample by differential pulse voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy. The biosensor's analytical performance was evaluated by differential pulse voltammetry, detecting up to $4.5 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$ of *C. auris* gDNA in urine (1:10, V/V). Moreover, the genosensor was reused eight times with no loss in the current signal response. The genosensor showed selectivity and stability, maintaining 100% of its response up to 80 days of storage. In order to analyze interactions of single and double-stranded DNA with ninhydrin, SEM, AFM and molecular dynamics studies followed by docking simulations were performed. Theoretical calculations showed ninhydrin interactions more favorably with dsDNA in an A-T rich binding pocket rather than with the ssDNA. Therefore, the proposed system is a promising electrochemical detection device towards a more accurate detection of *C. auris* gDNA in biological samples.

1. Introduction

Fungal pathogens are estimated to be a major cause for human morbidity and mortality, infecting billions and killing over 1.6 million people worldwide per year [1,2]. The emergence of drug-resistant pathogens is a medical concern issue since these microorganisms may cause severe human diseases [3].

Candida auris is a multi-resistant fungus, associated with nosocomial outbreaks in healthcare settings. It is a rising threat to public health, presenting high mortality and morbidity rates [4]. *C. auris* outbreaks have already been notified in COVID-19 hospitals [5] and patients with COVID-19 infected with this fungus have been reported [6]. Therefore, every health care facility should be severely monitored in order to contain this imminent threat since SARS-CoV-2 and *C. auris* combination might be deadly [7].

The *C. auris* accurate identification by phenotypic methods may be challenging [8] and this fungus cannot be identified using commonly commercial systems, and thus a suitable treatment is delayed [9]. Moreover, conventional laboratory techniques can lead to misidentification and improper handling, making it difficult to control the spread of *C. auris* in healthcare environments [10].

One of the most recent methods to detect pathogens is the development of biosensors [11]. Among biosensors, electrochemical genosensors stand out as devices with sequence-specific DNA detection, allowing them to precisely identify pathogens [12]. They present superior advantages due to their low cost, rapid results, selectivity, miniaturization capacity, instrumental and operational simplicity compared to most analytical techniques, and therefore offering the possibility for point-of-care (POC) diagnosis [13].

Electrochemical genosensors often utilize indirect or label-based

* Corresponding author.

E-mail address: agbrito@ufu.br (A.G. Brito-Madurro).

<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122694>

Received 24 April 2021; Received in revised form 2 July 2021; Accepted 6 July 2021

Available online 8 July 2021

0039-9140/© 2021 Published by Elsevier B.V.

detection methods, monitoring DNA hybridization by distinct electrochemical responses of a redox indicator which interact specifically with either single stranded (ss) or double stranded (ds) DNA [14,15].

Ninhydrin (1,2,3-Triketohydrindene monohydrate, NHN) is a well-known molecule commonly used for amino acid analysis due to its interaction with amino groups in protein and peptides [16]. In addition, ninhydrin has been reported to interact with heterocyclic nucleobases [17] and modify guide RNA in CRISPR systems [18].

However, ninhydrin potential as an electroactive hybridization indicator as well as the bioinformatics on its interaction with ssDNA and dsDNA applied to a genosensor technology has not been examined yet.

Therefore, the present paper reports a novel and reusable electrochemical genosensor capable of sensitive and selective detection of *C. auris* gDNA by differential pulse voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy. The DNA biosensor presented a remarkable regeneration ability and 100% of its signal response was maintained up to 80 days of storage. This straightforward approach is the first electrochemical genosensor for *C. auris* gDNA detection using ninhydrin as a novel hybridization indicator.

2. Material and methods

2.1. Chemicals and biomolecules

All chemicals were used without prior purification and presented analytical grade. High purity water (18.2 MΩ cm, Master System, Gehaka, Brazil) was used to prepare solutions which were deoxygenated by bubbling ultra-pure nitrogen before electrochemical measurements. Potassium chloride (99%, KCl) was purchased from Neon. Sulfuric acid (98%, H₂SO₄), K₄[Fe(CN)₆] and K₃[Fe(CN)₆] were obtained from Sigma-Aldrich Chemical, USA (ACS purity). Dibasic sodium phosphate (99%, Na₂HPO₄) and monobasic sodium phosphate (99%, NaH₂PO₄) were acquired from Synth. Ninhydrin (ACS reagent) was purchased from Sigma Aldrich.

The DNA probe (CAU1S) sequence was carefully designed using the National Center for Biotechnology Information (NCBI) data bank. The sequence can be identified by its RID (4TCMJJD2901R). CAU1S (5'-(HS) AACAAAACGAAAAAAGCGTAGA-3') was purchased from Alpha DNA (Canada) and a stock solution (1 mmol L⁻¹) was prepared using deionized water. *C. auris* gDNA was extracted using the in-house method [19]. The purity and quality of the samples were evaluated by spectrophotometry. To obtain a positive sample, human urine free of *C. auris* was diluted using deionized water (1:10, V/V) and enriched with gDNA of the fungus. For selectivity tests, nucleic acids from different organisms such as Zika virus, *Escherichia coli* and *Neisseria meningitidis* were used.

2.2. Instrumentation

Electrochemical measurements were performed using Differential Pulse Voltammetry (DPV) in a potentiostat CHI 760C (CH Instruments, USA). Autolab potentiostat/galvanostat PGSTAT302 N (Eco Chemie, Utrecht) with FRA module were used to perform Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS), using Nova 2.1.3 software. All electrochemical experiments were conducted using a three-electrode electrochemical cell, 2 mm diameter gold working electrodes, platinum wire as counter electrode and Ag/AgCl/Cl⁻ (3.0 mol L⁻¹ KCl) as reference electrode. The surface morphology of the electrodes was assessed by scanning probe microscopy (Model 5100 N, Hitachi), performed in the dynamic force microscope (DFM) mode, and by scanning electron microscopy (SEM) on an EVO MA10 Zeiss microscope.

2.3. Molecular modeling and computational protocol

The initial ssDNA and dsDNA structures were generated by ProtoNucleic-Acid Builder (pNAB) [20] and submitted to CHARMM-GUI

[21] in order to generate the input files for the molecular dynamic simulations. Equilibration, 10-ns production runs and analyses were conducted with GROMACS 5.1.4 [22] with similar protocol as previously published [23,24]. Ligand-binding hot spots were characterized with FTMap [25]. Molecular docking was performed with the GOLD (Genetic Optimization for Ligand Docking) 2020 [26] with the same protocol as previous study [27]. A more complete protocol is presented in the Supplementary Information section.

2.4. Fabrication of genosensor and *Candida auris* gDNA detection

Gold electrodes (Au) were submitted to mechanical and electrochemical conditioning. For mechanical preconditioning, Au were immersed in an ethanol solution (70%) and ultrasonicated for 10 min. Mechanical polishing was carried out using alumina slurry (0.3 μm), after being immersed in deionized water and sonicated for 2 min. Electrochemical preconditioning was performed using cyclic voltammetry in H₂SO₄ (0.5 mol L⁻¹), 6 cycles with potential ranging from 0.0 V to +1.4 V, 50 mV s⁻¹.

Probe immobilization was carried out by dripping 3.0 μL of CAU1S (20 μmol L⁻¹, pH 7.4) and after 30 min, Au/CAU1S was immersed in phosphate buffer saline (PBS) solution (0.1 mol L⁻¹, pH 7.4), for 7 s so that non-adsorbed capture probes are washed out.

CAU1S concentration used in the electrochemical detection was optimized by direct detection, monitoring the oxidation of guanosine and adenosine. DPV in PBS solution (0.1 mol L⁻¹, pH 7.4) was conducted with potential ranging from 0.6 V to +1.4 V, modulation amplitude 60 mV, interval time 0.2 s, scan rate 30 mV s⁻¹; interval time 0.2 s.

Hybridization procedure was performed by dripping 5 μL of urine (1:10, V/V) enriched with *C. auris* gDNA onto Au/CAU1S surface and conditioned in 55 °C for 20 min. Subsequently, Au/CAU1S:gDNA were immersed in PBS solution (0.1 mol L⁻¹, pH 7.4) for 7 s to wash unbound DNA from the Au/CAU1S surface.

Indirect detection was carried out by adding 5 μL of ninhydrin solution (100 μmol L⁻¹) onto Au/CAU1S:gDNA surface. After 10 min at room temperature, the unbounding ninhydrin was removed using deionized water by immersion of Au/CAU1S:gDNA/NHN for 7 s. DPV was recorded with potential ranging from -0.7 V to +0.2 V, modulation amplitude 60 mV, interval time 0.2 s, scan rate 30 mV s⁻¹; interval time 0.2 s using an electrolyte PBS solution (0.1 mol L⁻¹, pH 7.4). As proof of concept for DPV results, EIS studies using anionic probe K₄[Fe(CN)₆]/K₃[Fe(CN)₆] (5 mmol L⁻¹) in KCl solution (0.1 mol L⁻¹) were carried out immediately after DNA hybridization with an open circuit, a frequency ranging from 10 kHz to 0.1 Hz and amplitude of 10 mV.

The calibration curve was constructed by varying *C. auris* gDNA concentration in urine diluted using deionized water (1:10, V/V) ranging from 4.5 pg μL⁻¹ to 45 ng μL⁻¹. Differential pulse voltammograms were recorded as the analytical signal by indirect detection using ninhydrin as indicator in PBS solution (0.1 mol L⁻¹, pH 7.4).

2.5. Selectivity, regeneration and stability assays

In order to evaluate the selectivity of the genosensor, human urine sample (1:10, V/V) was enriched with nucleic acids from Zika virus, *Neisseria meningitidis* and *Escherichia coli* at the same concentration of the positive sample, *C. auris* gDNA (0.45 ng μL⁻¹) and added onto Au/CAU1S. For regeneration studies, Au/CAU1S:gDNA of *C. auris* was washed in PBS solution, pH 7.4, by immersion for 30 s. Subsequently, in order to de-hybridize *C. auris* gDNA from Au/CAU1S, the surface was immersed in water at 90 °C for 5 min. This procedure was repeated 8 times. After, DPV analysis were conducted using ninhydrin as an indicator. The stability of the genosensor was evaluated by maintaining Au/CAU1S bioelectrodes at 8 °C for 80 days. Then, electrochemical response was evaluated up to 80 days of storage. For selectivity, regeneration and stability assays, DPV was performed in PBS solution (0.1 mol L⁻¹, pH 7.4) and the oxidation peak of ninhydrin was monitored.

2.6. Statistics and data presentation

Arithmetic mean value $\pm$ standard deviation is represented for numeric numbers, performed in triplicate measurements. Histogram graphs were plotted using Prism Graph 6.0 and voltammograms using Origin 7 after baseline subtraction.

3. Results and discussion

3.1. Optimization of probe DNA immobilization on gold electrode

Efficient DNA probe immobilization onto an electrode surface plays an important role in the overall performance of genosensors [28]. Therefore, suitable probe orientation and its optimal concentration are relevant parameters to achieve a high-quality biosensor [29]. Three different concentrations of CAU1S DNA probe were evaluated by direct detection, monitoring guanosine and adenosine oxidation as shown in Fig. 1.

According to literature, DNA can be oxidized onto gold electrodes [30,31]. Fig. 1A shows two oxidation peaks at $E_p = +0.9$ V and $+1.3$ V corresponding to guanosine and adenosine oxidation peaks, respectively, at $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ of CAU1S. In addition, guanosine presented $i_p = 9.70 \pm 0.3 \mu\text{A}$ and adenosine $i_p = 2.1 \pm 0.1 \mu\text{A}$, according to Fig. 1B. No oxidation peak was detected for the other tested concentrations ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$ and $5 \mu\text{mol L}^{-1}$). Therefore, CAU1S at $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ was used in all assays as the optimal DNA probe concentration.

AFM imaging allows the investigation of biomolecules attached to the solid substrate. CAU1S immobilization was also evaluated by scanning probe microscopy. Bare gold electrode showed a typical rough surface with small valleys presenting quadratic roughness coefficient

(Rq) of 8.8 ± 1 nm, according to Fig. 1C. After the addition of CAU1S, a decrease in the Rq value (4.3 ± 0.3 nm) was observed (Fig. 1D). The decrease in the roughness value may be due the thiolated DNA probe which occupies the small valleys of the electrode surface, tending to form a smoother surface [32]. Also, studies on ssDNA physical properties indicate high conformational flexibility in solution [33] or onto solid surfaces, fitting more easily into the grooves of these surfaces [34].

3.2. Performance evaluation of genosensor

3.2.1. Calibration curve and sensibility

Candida auris is often detected in urine samples from contaminated people [35,36]. In this study, human urine sample (1:10, V/V) was enriched with different concentrations of *C. auris* gDNA and a calibration curve was constructed in order to evaluate the sensitivity of the genosensor. Indirect detection was carried out by DPV, monitoring ninhydrin oxidation peak as presented in Fig. 2.

The ninhydrin indicator used to monitor the duplex formation (CAU1S:gDNA) presented an increase in the oxidation peak $E_p = -0.25$ V (vs. Ag/AgCl/Cl⁻ (KCl 3.0 mol L^{-1})) as the concentration of *C. auris* gDNA increases in urine sample, according to Fig. 2A. It appears to present a higher affinity towards dsDNA. This behavior is also observed in other hybridization indicators, such as ethidium bromide [37] and Ru(NH₃)₆Cl₃ [38] which present high costs and potential toxicity [39]. As an alternative, ninhydrin offers great advantages as an electrochemical DNA hybridization indicator, such as low oxidation potential required (-0.25 V) and it is an economical and environment friendly molecule [40]. The biosensor detected up to $4.5 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$ with linear range from $45 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ to $4.5 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$ of gDNA in real sample, with equation $i_p \text{ (nA)} = 1756 - 147.92 \text{ (nA/g } \mu\text{L}^{-1}) * (-\log[\text{gDNA}]) \text{ (g } \mu\text{L}^{-1})$ and $R^2 = 0.99953$

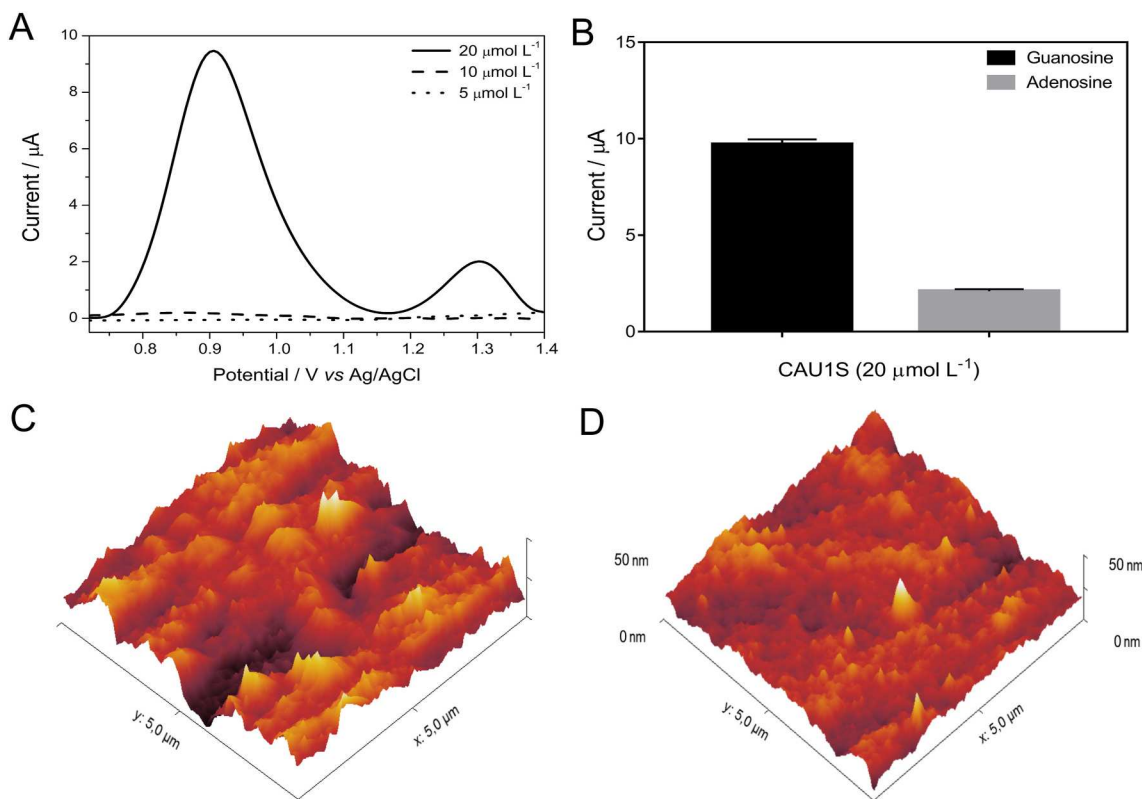


Fig. 1. Optimization of CAU1S DNA probe concentration onto gold electrodes. A) Differential pulse voltammograms for guanosine and adenosine oxidation at concentrations $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ (···), $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ (---) and $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ (—) in PBS solution (0.1 mol L^{-1} , pH 7.4). Potential scan from 0.6 V to $+1.4$ V; scan rate 30 mV s^{-1} ; modulation amplitude 60 mV ; interval time 0.2 s . B) Histogram for current values to the guanosine and adenosine oxidations at concentrations $20 \mu\text{mol L}^{-1}$. AFM images of the bare gold electrode (C) and Au/CAU1S (D). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

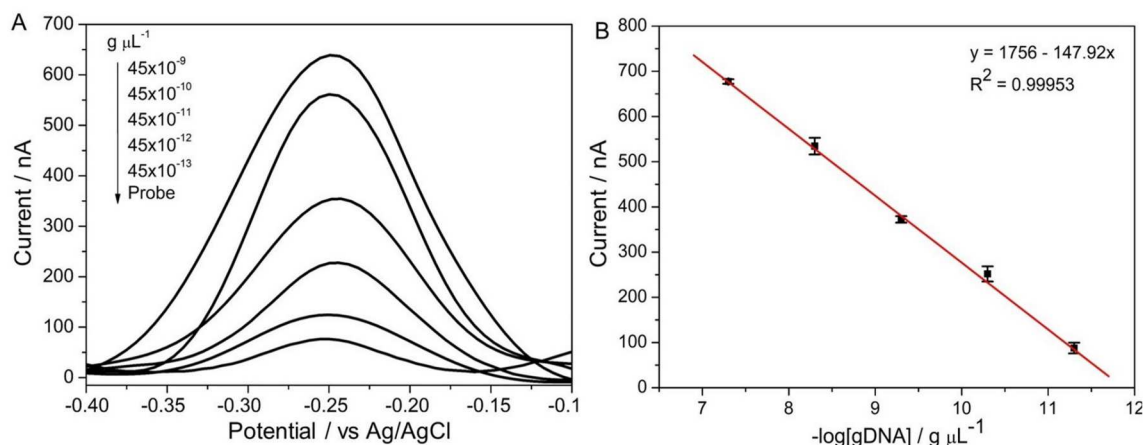


Fig. 2. Electrochemical response for indirect detection of *C. auris* gDNA added in urine (1:10, V/V) at different concentrations monitoring ninhydrin oxidation peak and the calibration curve. A) Differential pulse voltammograms recorded in PBS solution (0.1 mol L^{-1} , pH 7.4), in absence or presence of target analyte, varying its concentration (45×10^{-13} g μL^{-1} , 45×10^{-12} g μL^{-1} , 45×10^{-11} g μL^{-1} , 45×10^{-10} g μL^{-1} and 45×10^{-9} g μL^{-1}). Conditions: potential scan from -0.7 V to $+0.2 \text{ V}$; scan rate 30 mV s^{-1} ; modulation amplitude 60 mV ; interval time 0.2 s . B) Calibration plots for the amperometric response.

(Fig. 2B).

3.2.2. Selectivity, reusability and stability

Parameters such as selectivity, regeneration and stability were evaluated by indirect detection, monitoring the current response of ninhydrin oxidation (Fig. 3).

Au/CAU1S genosensor was sensitized with gDNA from non-target

pathogens which are also found in urine such as *Candida albicans* [41], Zika virus gRNA [42], *Neisseria meningitidis* [43] and *Escherichia coli* gDNAs [44] at the same concentration of *C. auris* gDNA ($0.45 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$). The genosensor was able to distinguish all non-specific pathogens DNA and presented a similar current value when compared to the probe current response, according to Fig. 3A. *C. albicans* gDNA with $i_p = 70 \pm 2.6 \text{ nA}$, Zika virus gRNA with $i_p = 57.7 \pm 1.5 \text{ nA}$, *N. meningitidis* gDNA

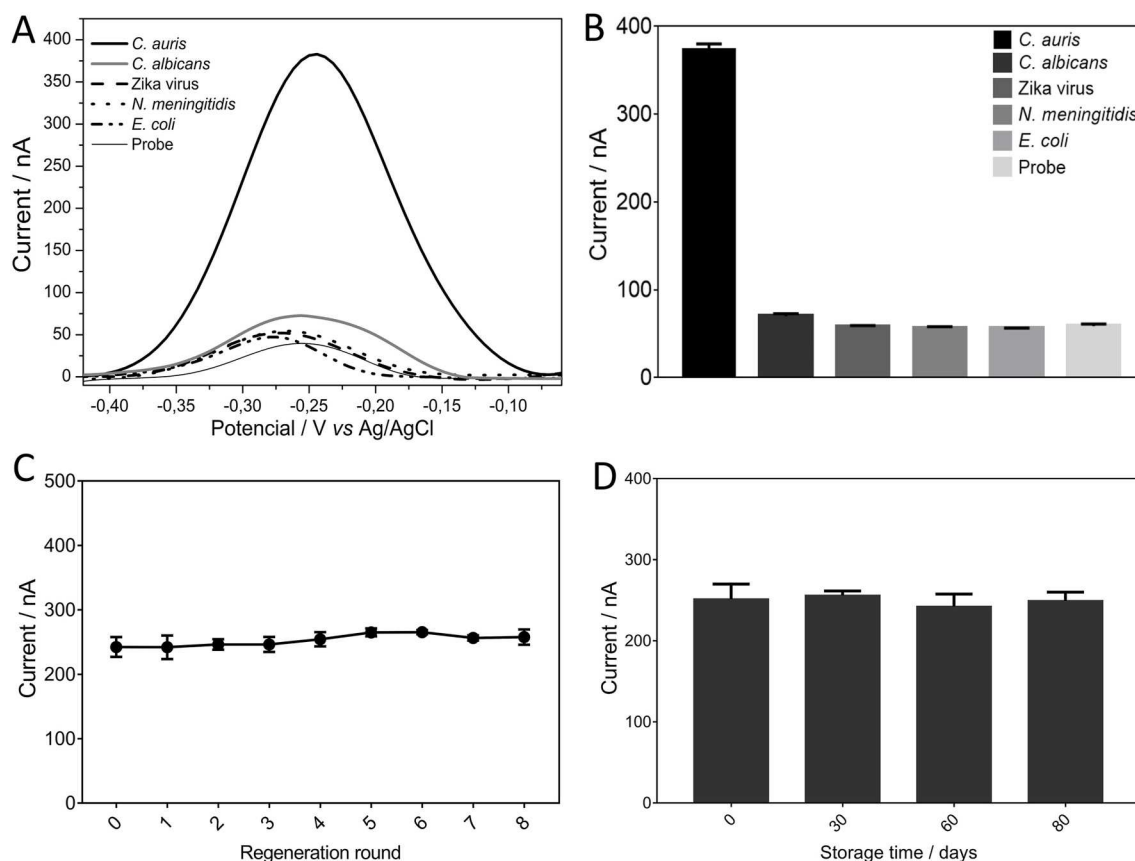


Fig. 3. A) Differential pulse voltammograms and B) histogram of current value for the detection of *C. auris* gDNA and non-specific biomolecules: *C. albicans*, Zika virus gRNA, *N. meningitidis* and *E. coli*. C) Relation between i_p and regeneration rounds. D) Relation between i_p and storage time of the genosensor. DPV was recorded in PBS solution (0.1 mol L^{-1} , pH 7.4); potential scan from -0.7 V to $+0.2 \text{ V}$; scan rate 30 mV s^{-1} ; modulation amplitude 60 mV ; interval time 0.2 s . Ninhydrin oxidation peak was monitored in all experiments.

with $i_p = 56.3 \pm 1.5$ nA and *E. coli* gDNA with $i_p = 55.7 \pm 0.6$ nA, presented 5.3-fold, 6.5-fold, 6.6-fold and 6.7-fold decrease in peak current variation, respectively, comparing to the positive control ($i_p = 373 \pm 9.9$ nA), as observed in Fig. 3B. In addition, a misidentification of *C. auris* as *N. meningitidis* and *C. albicans* has been reported [45,46]. Nevertheless, the present genosensor showed superior selectivity since it was able to accurately discriminate *C. auris* from *N. meningitidis* and *C. albicans*.

In order to obtain a cost-effective point-of-care diagnosis, regeneration assay is an important feature to accelerate biosensor commercialization [47], since it evaluates the ability of DNA hybridization reaction to re-occur between gDNA and CAU1S. As result of an effective chemisorption between 5' thiol labeled DNA probe and the gold surface [48], the genosensor presented high reusability, maintaining 100% of its current response signal over 8 regeneration cycles, according to Fig. 3C. The genosensor's stability was examined by keeping the bioelectrodes at 4 °C over 80 days. Fig. 3D shows the DNA biosensor being able to maintain 100% of its signal response up to 80 days of storage.

C. auris is mostly detected by quantitative real-time PCR (qPCR) [49, 50]. However, qPCR is a laborious operational procedure which presents some challenges towards a point-of-care diagnosis, including high cost and unstable results [51]. To the best of our knowledge, no electrochemical genosensor for the detection of *C. auris* gDNA in urine samples using ninhydrin as DNA hybridization indicator has been reported. Therefore, Table 1 presents recently reported methodologies able to identify *C. auris*.

In this work, the developed genosensor showed superior features such as linear range, rapid response and small amount of sample required. In addition, all previously reported detection methods (see Table 1) lack important studies such as stability and regeneration.

3.3. Evaluation of the genosensor by bioinformatics, EIE and morphological analysis

3.3.1. Computational analysis of ninhydrin in complex with DNA

Ninhydrin interactions with DNA were evaluated by theoretical approaches in order to obtain some insights for the DNA-ninhydrin binding mechanism (Fig. 4).

Initially, molecular dynamics simulations were performed with the modeled ssDNA and dsDNA biomolecules with the results presented in Fig. 4A and B, respectively. Fig. 4A and B shows the radius of gyration (R_g) and the total energy of the molecules simulated during a total time of 10 ns? Both structures were reasonably stable during the simulations which reflected the constant R_g and energy along the 10 ns-runs. However, ssDNA was more extended than dsDNA which could be seen by the higher R_g for ssDNA ($R_g \approx 3.0$ nm in A) than for dsDNA ($R_g \approx 2.5$ nm in B), despite of both molecules having the same initial length. R_g is a measure that considers the average atomic position of a molecule in a specific time, thus, ssDNA samples more extended conformations than dsDNA.

Table 1

Comparison of proposed genosensor for *C.auris* gDNA detection with other methodologies.

Methodology	Sample volume	Time of detection	Stability	Regeneration	Reference
Fluorescence	100 μ L	60 min	n.a	n.a	[56]
Spectroscopy	50 μ L	100 min	n.a	n.a	[57]
BCID-FP (GenMark Dx ePlex)					
Multiplex PCR and qPCR	4 μ L	~79 min	n.a	n.a	[58]
CHROMagar	1 μ L	36 h	n.a	n.a	[59]
LAMP	2 μ L	90 min	n.a	n.a	[60]
DPV indirect detection	5 μ L	32 min	100 days	8 times	This study

Molecular dynamic simulations create conformations by stochastic or diffusive motions on a roughed energy landscape profile [57]. Simulations of Fig. 4A and B resulted in equilibrated and constant-temperature runs. The final conformations are located in local energy minima in which they might be good representatives of the conformation ensemble for the docking analysis with ninhydrin.

The next step would be to perform molecular docking simulations of ninhydrin against the final DNA structures. Although, before that, the initial and final conformations of ssDNA (structures in Fig. 4A) and dsDNA (structures in Fig. 4B) were submitted to the FTMap [25] web server in order to characterize possible binding cavities. In Figure S1 (see Supplementary Information), FTMap predicted the initial conformations of ssDNA (Fig. S1A, left panel) and dsDNA (Fig. S1C, left panel) having a broad distribution of binding sites that were represented by the small molecule decoys bound to the DNAs surfaces. Also, the nonbonded contact rate of the decoys along the nucleic acid sequence of both molecules were broadly distributed with two slightly higher peaks around nucleotides DG9 and DG21, numbering from its 5'- to 3'-end (left panels of Figs. S1B and S1D). However, the equilibrated conformations represented by the final structures resulted in different conformations for both biopolymers. The end-point of the ssDNA simulation resulted in a more extended conformation than its initial structure and the decoys were found more pronounced around nucleotides DA13 and DA18 (right panels of Fig. S1A and S1B). The final dsDNA structure resulted in a slightly smaller conformation than its initial perfect double helix, producing one pronounced binding site around nucleotide DG19. Thereafter, this nucleotide position was chosen to be the major binding cavity as it appears in both nucleic acid structures.

The last snapshot of the molecular dynamic runs of both structures in Fig. 4A and B were submitted to docking simulations with the hybridization indicator ninhydrin. Although the binding site for the docking runs were centered at nucleotide DG19, the binding cavity was sufficiently big (10 Å) to cover some more nucleotides. Generated by the docking simulations, the top-ranked configurations of ninhydrin in complex with ssDNA and dsDNA were chosen for analysis and they are presented in Fig. 4C and D, respectively. Ninhydrin was captured by the two nucleotides (DG19 and DC20) on the ssDNA surface and by an A-T rich region around DA17 of dsDNA that is a more confined binding pocket (surface representation on the right panels in Fig. 4C and D). Hydrogen bonds were the main stabilizing interaction of the hybridization indicator in both DNAs, with an extra hydrogen bond occurring in dsDNA. Also, the dsDNA-ninhydrin complex exhibited an exclusive hydrophobic interaction, represented by the surface of DA15 nucleotide in Fig. 4D. Similar mode of interaction of a compound bound in a A-T rich region of a double strand DNA was also reported in a recent publication [58].

The theoretical calculations suggest that the hybridization indicator ninhydrin has a more favourable interaction with the double helix dsDNA than with the single strand ssDNA. This is in accordance with the experimental results which showed an increased sensitivity of the dsDNA genosensor when compared with ssDNA, revealing ninhydrin as a novel DNA hybridization indicator.

3.3.2. Electrochemical impedance spectroscopy and morphological analysis

The characterization of the Au/CAU1S and Au/CAU1S:C. *auris* gDNA was performed by EIS, SEM and AFM images (Fig. 5).

Au/CAU1S was sensitized with urine samples (1:10, V/V) with or without the enrichment of *C. auris* gDNA (4.5 ng μ L⁻¹). In the presence of gDNA, a 4.8-Fold increase in the resistance to charge transfer (R_{CT}) value (25.7 ± 1.4 k Ω) was observed compared to Au/CAU1S/Urine which presented $R_{CT} = 5.3 \pm 0.5$ k Ω , according to Fig. 5B. These findings corroborate with DPV results, after the duplex formation (Au/CAU1S: gDNA), an increase in the amount of DNA on the Au surface is observed, leading to an increase in the R_{CT} value for the positive sample [59].

It was possible to observe different morphologies in the SEM images, with the addition of the positive target (Fig. 5D) causing a change in the

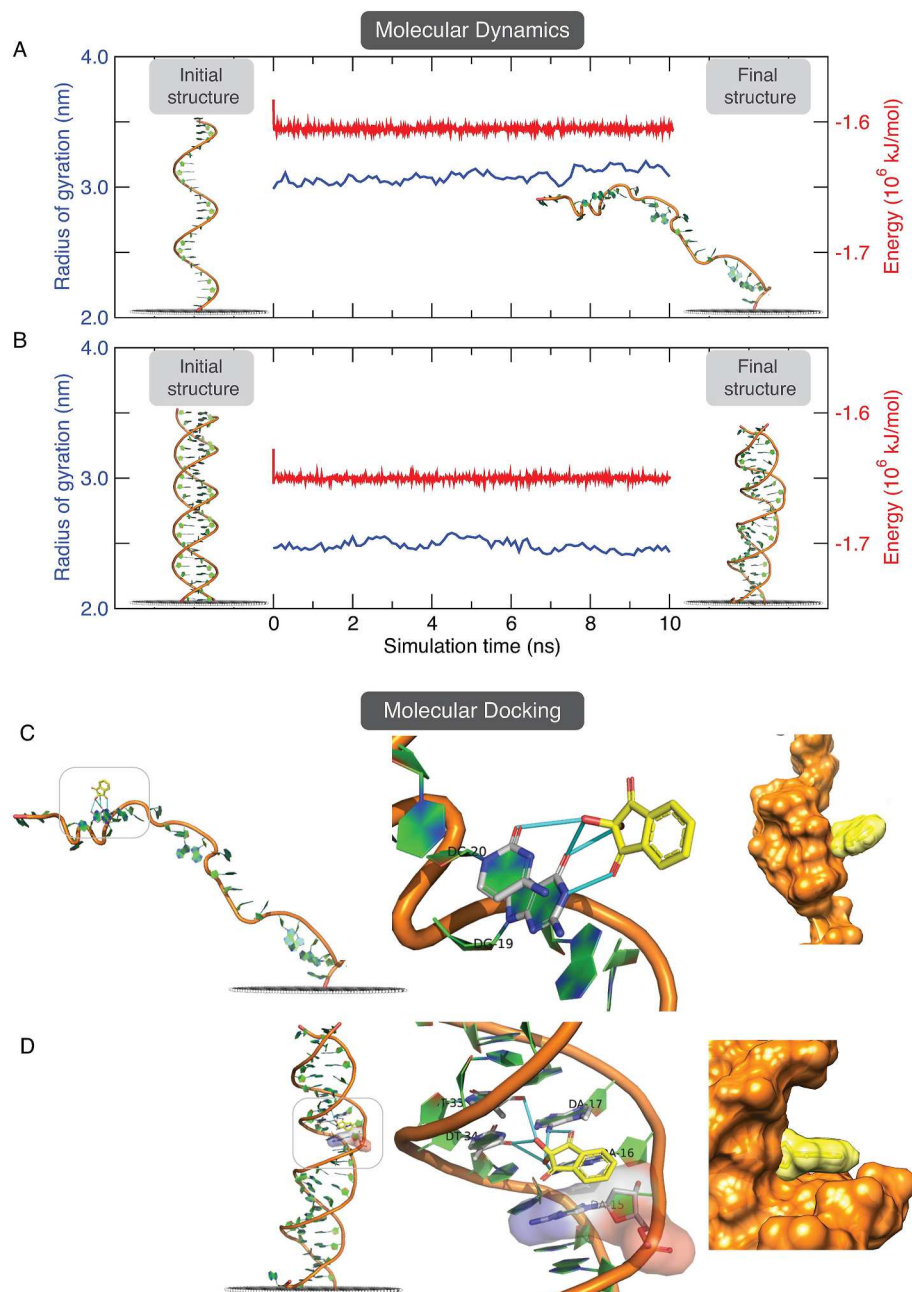


Fig. 4. Theoretical molecular modeling of the interaction between ninhydrin and DNA. Radius of gyration (Rg, blue) and total energy (red) of the molecular dynamics simulations performed with A) ssDNA and B) dsDNA. Initial structures and the final stable configurations of the simulated biomolecules are also presented in A) and B). Molecular docking of ninhydrin (yellow stick) bound with the simulated final structures of C) ssDNA and D) dsDNA. C) and D) also show a close-up of the docked poses on the middle panels and a surface representation on the right panels. Ninhydrin is mainly stabilized via hydrogen bonds (cyan sticks) in both biomolecules, however, only on dsDNA, ninhydrin appears to be stabilized by hydrophobic interactions (surface representation in D). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

surface of the working electrode, making it more heterogeneous with structures in filamentous form or network-like structures when compared with the negative sample (healthy urine) (Fig. 5C). This may be due to the formation of the DNA duplex after adding the positive target, since double stranded nucleic acids tend to be less flexible than single stranded nucleic acids [60], that can be observed with the formation of different structures on the electrode surface [61]. In both SEM and AFM images it was possible to observe structures approximately 100 nm in size, a common feature in urine samples as a result of drying on solid surfaces [62] and adsorption of solid components present in the sample.

Scanning probe microscopy is also a valuable technique to evaluate DNA hybridization in solid surfaces [63]. The addition of the negative sample resulted in images with lower coefficients of roughness ($R_q = 2.9 \pm 0.2$ nm, Fig. 5E), presenting a predominantly smooth surface with sparse elevation points. In contrast, the electrodes in which the positive samples (urine enriched with gDNA of *C. auris*) were applied showed

bigger coefficients of roughness ($R_q = 17 \pm 1.3$ nm, Fig. 5F) and a wavy surface, corroborating with the SEM images. The hybridization of the DNA oligonucleotide probe on the electrode surface with the complementary DNA in the sample creates more prominent clusters and structures on the electrode surface [64].

4. Conclusion

In summary, a facile and straightforward approach to detect *C. auris* gDNA in real samples was described based on the electrochemical detection using ninhydrin as a novel DNA hybridization indicator. The analytical features of biosensor were evaluated and presented a linear response from $4.5 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$ to $45 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ of gDNA in urine (1:10, V/V) capable of detecting up to $4.5 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$. Moreover, the genosensor was reused eight times with no loss in the current signal response. The genosensor showed selectivity and stability, maintaining 100% of its response up to 80 days of storage, which indicates shelf-life potential, an

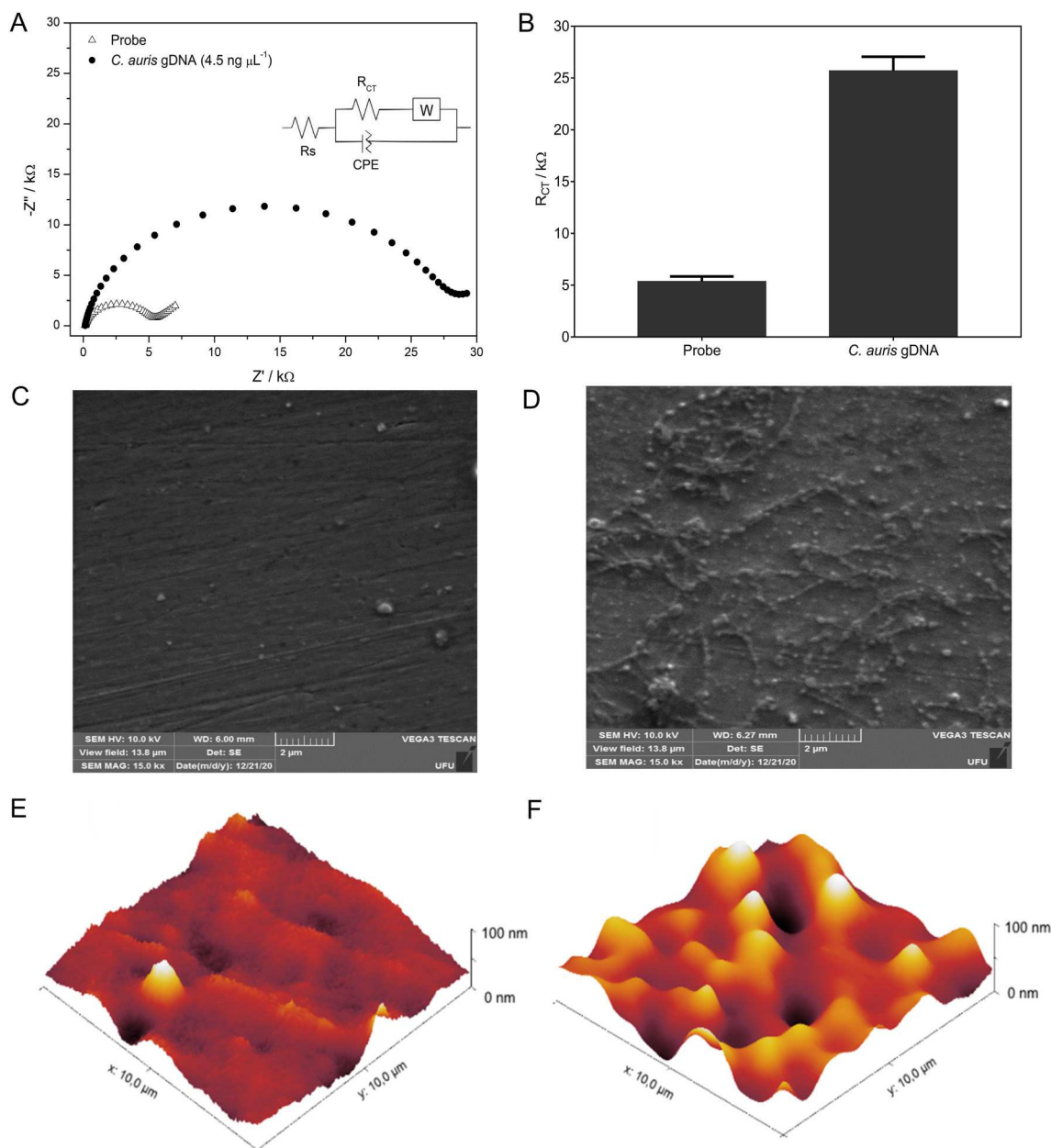


Fig. 5. Electrochemical impedance spectroscopy and morphological analysis. A) Nyquist plots for *C. auris* gDNA detection by EIS. Inset: equivalent circuit, where, R_s , W , R_{CT} and CPE represent the solution resistance, the Warburg diffusion resistance, the charge-transfer resistance and the constant-phase element, respectively. EIS conducted with $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (5 mmol L^{-1}) in KCl solution (0.1 mol L^{-1}), open circuit, frequency ranging from 10 kHz to 0.1 Hz and amplitude of 10 mV. B) Histogram of RCT from the EIS detection of urine (1:10, V/V) without and with *C. auris* gDNA enrichment. SEM and AFM images of Au/CA1US/urine sample without (E) or with (F) *C. auris* gDNA enrichment.

important feature for commercialization. Theoretical calculations support the electrochemical results which reinforce ninhydrin presenting a more favourable interaction with dsDNA than with ssDNA. Therefore, the developed genosensor is a promising electrochemical detection towards the demand for a more accurate identification of *C. auris* gDNA in biological samples.

Credit author statement

Pedro H.G. Guedes: Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Investigation, Writing – original draft. Jéssica G. Brussasco: Methodology, Investigation, Writing – original draft. Anna C.R. Moço: Methodology, Investigation, Writing – original draft. Dayane D. de Moraes: Methodology, Investigation, Writing – original draft. José M. R.

Flauzino: Methodology, Investigation, Writing – original draft. Luiz F.G. Luz: Methodology, Investigation. Margarete T.G. Almeida: Investigation, *C. Auris* and *C. Albicans* sample supply. Márcia N. Soares: Investigation, *C. Auris* and *C. Albicans* DNA extraction. Ronaldo J. Oliveira: Molecular Modeling, Conceptualization, Methodology, Investigation, Writing – original draft. João M. Madurro: Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Writing – review & editing, Ana G. Brito-Madurro: Supervision, Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Writing – review & editing, Funding acquisition.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence

the work reported in this paper.

Acknowledgements

Financial support was provided by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, APQ-00941-14) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, 438316/2018-5 and 312328/2019-2). Computational resources were provided by by Núcleo de Computação Científica da Universidade do Estado de São Paulo (NCC/GridUnesp) and Centro Nacional de Processamento de Alto Desempenho em São Paulo (CENAPAD-SP).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122694>.

References

- [1] R. Hasbun, C.K. Bloch, A. Bhimraj, Neurological Complications of Infections Diseases, Springer, 2021, https://doi.org/10.1007/978-3-030-56084-3_10.
- [2] A. König, R. Müller, S. Mogavero, B. Hube, Fungal factors involved in host immune evasion, modulation and exploitation during infection, *Cell Microbiol.* 23 (2021), <https://doi.org/10.1111/cmi.13272>.
- [3] A. Narmani, R.B. Teponno, M. Arzanlou, F. Surup, S.E. Helaly, K. Wittstein, D. F. Praditya, A. Babai-Ahari, E. Steinmann, M. Stadler, Cytotoxic, antimicrobial and antiviral secondary metabolites produced by the plant pathogenic fungus *Cytospora* sp. CCTU A309, *Fitoterapia* 134 (2019) 314–322, <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2019.02.015>.
- [4] H. Du, J. Bing, T. Hu, C.L. Ennis, C.J. Nobile, G. Huang, *Candida auris*: epidemiology, biology, antifungal resistance, and virulence, *PLoS Pathog.* 16 (2020), e1008921, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008921>.
- [5] Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Fungal Diseases and COVID-19, 2021 (accessed March 19, 2021), <https://www.cdc.gov/fungal/covid-fungal.html>.
- [6] H. Villanueva-Lozano, R. de J. Treviño-Rangel, G.M. González, M.T. Ramírez-Elizondo, R. Lara-Medrano, M.C. Aleman-Bocanegra, C.E. Guajardo-Lara, N. Gaona-Chávez, F. Castilleja-Leal, G. Torre-Amione, M.F. Martínez-Reséndez, Outbreak of *Candida auris* infection in a COVID-19 hospital in Mexico, *Clin. Microbiol. Infect.* (2021), <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.12.030>.
- [7] R.A. Schwartz, R. Kapila, Cutaneous manifestations of a 21st century worldwide fungal epidemic possibly complicating the COVID-19 pandemic to jointly menace mankind, *Dermatol. Ther.* 33 (2020), <https://doi.org/10.1111/dth.13481>.
- [8] P.A. Armstrong, S.M. Rivera, P. Escandon, D.H. Caceres, N. Chow, M.J. Stuckey, J. Díaz, A. Gomez, N. Vélez, A. Espinosa-Bode, S. Salcedo, A. Marin, I. Berrio, C. Varón, A. Guzman, J.E. Pérez-Franco, J.D. Escobar, N. Villalobos, J.M. Correa, A. P. Litvintseva, S.R. Lockhart, R. Fagan, T.M. Chiller, B. Jackson, O. Pacheco, Hospital-associated multicenter outbreak of emerging fungus *Candida auris*, *Colombia*, 2019, *Emerg. Infect. Dis.* 25 (2016) 1339–1346, <https://doi.org/10.3201/eid2507.180491>.
- [9] A. Ruiz-Gaitán, A.M. Moret, M. Tasiás-Pitarch, A.I. Aleixandre-López, H. Martínez-Morel, E. Calabuig, M. Salavert-Lletí, P. Ramírez, J.L. López-Hontangas, F. Hagen, J.F. Meis, J. Mollar-Maseres, J. Pemán, An outbreak due to *Candida auris* with prolonged colonisation and candidaemia in a tertiary care European hospital, *Mycoses* 61 (2018) 498–505, <https://doi.org/10.1111/myc.12781>.
- [10] Centers for Disease Control and Prevention (CDC), *Candida auris*, 2021 (accessed March 19, 2021), <https://www.cdc.gov/fungal/candida-auris/index.html>.
- [11] A. Mobed, B. Baradaran, M. de la Guardia, M. Agazadeh, M. Hasanzadeh, M. A. Rezaee, J. Mosafar, A. Mokhtarzadeh, M.R. Hamblin, Advances in detection of fastidious bacteria: from microscopic observation to molecular biosensors, *TrAC Trends Anal. Chem.* (Reference Ed.) 113 (2019) 157–171, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.02.012>.
- [12] K. Nejati, M. Dadashpour, T. Gharibi, H. Mellatyar, A. Akbarzadeh, Biomedical applications of functionalized gold nanoparticles: a review, *J. Cluster Sci.* (2021), <https://doi.org/10.1007/s10876-020-01955-9>.
- [13] I.R. Suhito, K.M. Koo, T.H. Kim, Recent advances in electrochemical sensors for the detection of biomolecules and whole cells, *Biomedicines* 9 (2021) 1–20, <https://doi.org/10.3390/biomedicines9010015>.
- [14] E.E. Ferapontova, Hybridization biosensors relying on electrical properties of nucleic acids, *Electroanalysis* 29 (2017) 6–13, <https://doi.org/10.1002/elan.201600593>.
- [15] A. Erdem, E. Eksin, G. Kadikoylu, E. Yildiz, Voltammetric detection of miRNA hybridization based on electroactive indicator-cobalt phenanthroline, *Int. J. Biol. Macromol.* 158 (2020) 819–825, <https://doi.org/10.1016/j.ibi.2020.04.168>.
- [16] A.E. Fazary, K.F. Fawy, M.Z. Bani-Fwaz, T. Sahlabji, H.S.M. Abd-Rabbob, Thermodynamic studies on metal ions – ninhydrin – Glycine interactions in aqueous solutions, *J. Chem. Thermodyn.* 118 (2018) 302–315, <https://doi.org/10.1016/j.jct.2017.12.005>.
- [17] R. Shapiro, J. Hachmann, The reaction of guanine derivatives with 1,2-dicarbonyl compounds, *Biochemistry* 5 (1966) 2799–2807, <https://doi.org/10.1021/bi00873a004>.
- [18] S. Wang, H. Huang, J. Liu, L. Wei, L. Wu, W. Xiong, P. Yin, T. Tian, X. Zhou, The manipulation of RNA-guided nucleic acid cleavage with ninhydrin chemistry, *Adv. Sci.* 7 (2020) 1903770, <https://doi.org/10.1002/adv.201903770>.
- [19] A. Bolano, S. Stinchii, R. Preziosi, F. Bistoni, M. Allegrucci, F. Baldelli, A. Martini, G. Cardinali, Rapid methods to extract DNA and RNA from *Cryptococcus neoformans*, *FEMS Yeast Res.* 1 (2001) 221–224, [https://doi.org/10.1016/S1567-1356\(01\)00030-7](https://doi.org/10.1016/S1567-1356(01)00030-7).
- [20] A. Alenaizan, J.L. Barnett, N.V. Hud, C.D. Sherrill, A.S. Petrov, The proto-Nucleic Acid Builder: a software tool for constructing nucleic acid analogs, *Nucleic Acids Res.* 49 (2021) 79–89, <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1159>.
- [21] J. Lee, X. Cheng, J.M. Swails, M.S. Yeom, P.K. Eastman, J.A. Lemkul, S. Wei, J. Buckner, J.C. Jeong, Y. Qi, S. Jo, V.S. Pande, D.A. Case, C.L. Brooks, A. D. MacKerell, J.B. Klauda, W. Im, CHARMM-GUI input generator for NAMD, GROMACS, AMBER, OpenMM, and CHARMM/OpenMM simulations using the CHARMM36 additive force field, *J. Chem. Theor. Comput.* 12 (2016) 405–413, <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00935>.
- [22] D. Van Der Spoel, E. Lindahl, B. Hess, G. Groenhof, A.E. Mark, H.J.C. Berendsen, GROMACS: fast, flexible, and free, *J. Comput. Chem.* 26 (2005) 1701–1718, <https://doi.org/10.1002/jcc.20291>.
- [23] F.C. Freitas, P.H.B. Ferreira, D.C. Favaro, R.J. de Oliveira, Shedding light on the inhibitory mechanisms of SARS-CoV-1/CoV-2 spike proteins by ACE2-designed peptides, *acs.jcim.0c01320*, *J. Chem. Inf. Model.* (2021), <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.0c01320>.
- [24] L.M. Alves, H.L.S. Barros, J.M.R. Flauzino, P.H.G. Guedes, J.M. Pereira, R. T. Fujiwara, T.W.P. Mineo, J.R. Mineo, R.J. de Oliveira, J.M. Madurro, A.G. Brito-Madurro, A novel peptide-based sensor platform for detection of anti-Toxoplasma gondii immunoglobulins, *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* 175 (2019) 112778, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.112778>.
- [25] D. Kozakov, L.E. Grove, D.R. Hall, T. Bohnuud, S.E. Mottarella, L. Luo, B. Xia, D. Beglov, S. Vajda, The FTMap family of web servers for determining and characterizing ligand-binding hot spots of proteins, *Nat. Protoc.* 10 (2015) 733–755, <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.043>.
- [26] M.L. Verdonk, J.C. Cole, M.J. Hartshorn, C.W. Murray, R.D. Taylor, Improved protein-ligand docking using GOLD, *Proteins Struct. Funct. Bioinform.* 52 (2003) 609–623, <https://doi.org/10.1002/prot.10465>.
- [27] G. Tomasello, I. Armenia, G. Molla, The Protein Imager: a full-featured online molecular viewer interface with server-side HQ-rendering capabilities, *Bioinformatics* 36 (2020) 2909–2911, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btaa009>.
- [28] J. Watterson, P.A.E. Piuino, U.J. Krull, Practical physical aspects of interfacial nucleic acid oligomer hybridisation for biosensor design, *Anal. Chim. Acta* 469 (2002) 115–127, [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(02\)00125-3](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(02)00125-3).
- [29] A. Mobed, M. Hasanzadeh, S. Hassanpour, A. Saadati, M. Agazadeh, A. Mokhtarzadeh, An innovative nucleic acid based biosensor toward detection of *Legionella pneumophila* using DNA immobilization and hybridization: a novel genosensor, *Microchem. J.* 148 (2019) 708–716, <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.05.027>.
- [30] J.V. da Silva, A.G.B. Madurro, J.M. Madurro, Modified electrode with reduced graphene oxide/poly(3-hydroxyphenylacetic acid): a new platform for oligonucleotide hybridization, *J. Solid State Electrochem.* 21 (2017) 2129–2139, <https://doi.org/10.1007/s10008-017-3601-8>.
- [31] H.A.M. Faria, V. Zucolotto, Label-free electrochemical DNA biosensor for Zika virus identification, *Biosens. Bioelectron.* 131 (2019) 149–155, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.02.018>.
- [32] D.A. Oliveira, J.V. Silva, J.M.R. Flauzino, A.C.H. Castro, A.C.R. Moço, M.M.C. N. Soares, J.M. Madurro, A.G. Brito-Madurro, Application of nanomaterials for the electrical and optical detection of the hepatitis B virus, *Anal. Biochem.* 549 (2018) 157–163, <https://doi.org/10.1016/j.ab.2018.03.023>.
- [33] M.C. Murphy, I. Rasnik, W. Cheng, T.M. Lohman, T. Ha, Probing single-stranded DNA conformational flexibility using fluorescence spectroscopy, *Biophys. J.* 86 (2004) 2530–2537, [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(04\)74308-8](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(04)74308-8).
- [34] A.M. Oliveira-Brett, A.-M. Chiorcea, Atomic force microscopy of DNA immobilized onto a highly oriented pyrolytic graphite electrode surface, *Langmuir* 19 (2003) 3830–3839, <https://doi.org/10.1021/la027047d>.
- [35] N. Griffith, L. Danziger, *Candida auris* urinary tract infections and possible treatment, *Antibiotics* 9 (2020) 898, <https://doi.org/10.3390/antibiotics9120898>.
- [36] A. Al-Rashdi, A. Al-Maani, A. Al-Wahaibi, A. Alqayoudhi, A. Al-Jardani, S. Al-Abri, Characteristics, risk factors, and survival analysis of *Candida auris* cases: results of one-year national surveillance data from Oman, *J. Fungi* 7 (2021) 31, <https://doi.org/10.3390/jof7010031>.
- [37] A.C.H. Castro, E.G. França, L.F. De Paula, M.M.C.N. Soares, L.R. Goulart, J. M. Madurro, A.G. Brito-Madurro, Preparation of genosensor for detection of specific DNA sequence of the hepatitis B virus, *Appl. Surf. Sci.* 314 (2014) 273–279, <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2014.06.084>.
- [38] M. Du, T. Yang, X. Li, K. Jiao, Fabrication of DNA/graphene/polyaniline nanocomplex for label-free voltammetric detection of DNA hybridization, *Talanta* 88 (2012) 439–444, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.10.054>.
- [39] J.I.A. Rashid, N.A. Yusof, The strategies of DNA immobilization and hybridization detection mechanism in the construction of electrochemical DNA sensor: a review, *Sens. Bio-Sens. Res.* 16 (2017) 19–31, <https://doi.org/10.1016/j.sbsr.2017.09.001>.
- [40] A. Surleva, M. Zaharia, O. Pintilie, I. Sandu, L. Tudorachi, R.V. Gradinaru, Improved ninhydrin-based reagent for spectrophotometric determination of ppb levels of cyanide, *Environ. Forensics* 17 (2016) 48–58, <https://doi.org/10.1080/15275922.2015.1091404>.
- [41] S. Lal, O. Parkash, P. Kumar, Z.A. Malik, K. Unar, Z. Ahmed, M. Maitlo, A.A. Unar, S. Sapna, Determination of predisposing factors in developing *Candida albicans*

- associated urinary tract infection and antifungal sensitivity profile, *J. Pharm. Res. Int.* 33 (2021) 40–49, <https://doi.org/10.9734/jpri/2021/v33i631188>.
- [42] M.C. Bonaldo, I.P. Ribeiro, N.S. Lima, A.A.C. dos Santos, L.S.R. Menezes, S.O.D. da Cruz, I.S. de Mello, N.D. Furtado, E.E. de Moura, L. Damasceno, K.A.B. da Silva, M. G. de Castro, A.L. Gerber, L.G.P. de Almeida, R. Lourenço-de-Oliveira, A.T. R. Vasconcelos, P. Brasil, Isolation of infective zika virus from urine and saliva of patients in Brazil, *PLoS Neglected Trop. Dis.* 10 (2016), e0004816, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004816>.
- [43] E. Toh, J.A. Williams, B. Qadadri, A. Ermel, D.E. Nelson, Development of a SimpleProbe real-Time PCR Assay for rapid detection and identification of the US novel urethrotropic clade of *Neisseria meningitidis* ST-11 (US NmUC), *PLoS One* 15 (2020), e0228467, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228467>.
- [44] M.M. Munch, L.C. Chambers, L.E. Manhart, D. Domogala, A. Lopez, D.N. Fredricks, S. Srinivasan, Optimizing bacterial DNA extraction in urine, *PLoS One* 14 (2019), e0222962, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222962>.
- [45] S. Mahmoudi, S. Agha Kuchak Afshari, S. Aghaei Gharehbolagh, H. Mirhendi, K. Makimura, Methods for identification of *Candida auris*, the yeast of global public health concern: a review, *J. Mycol. Med.* 29 (2019) 174–179, <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2019.04.004>.
- [46] C.M. Parra-Giraldo, S.L. Valderrama, G. Cortes-Fraile, J.R. Garzón, B.E. Ariza, F. Morio, M.Y. Linares-Linares, A. Ceballos-Garzón, A. de la Hoz, C. Hernandez, C. Alvarez-Moreno, P. Le Pape, First report of sporadic cases of *Candida auris* in Colombia, *Int. J. Infect. Dis.* 69 (2018) 63–67, <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2018.01.034>.
- [47] A. Sobhan, J.-H. Oh, M.-K. Park, J. Lee, Reusability of a single-walled carbon nanotube-based biosensor for detecting peanut allergens and *Y. enterocolitica*, *Microelectron. Eng.* 225 (2020) 111281, <https://doi.org/10.1016/j.mee.2020.111281>.
- [48] L. Martínez, L.G. Carrascosa, Y. Huttel, L.M. Lechuga, E. Román, Influence of the linker type on the Au-S binding properties of thiol and disulfide-modified DNA self-assembly on polycrystalline gold, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 12 (2010) 3301–3308, <https://doi.org/10.1039/b924504a>.
- [49] O. Georgacopoulos, N.S. Nunnally, N. Le, C. Lysen, R.M. Welsh, M. Kordalewska, D. S. Perlin, E.L. Berkow, D. Joseph Sexton, Performance evaluation of culture-independent sybr green *Candida auris* quantitative PCR diagnostics on anterior nares surveillance swabs, *J. Clin. Microbiol.* 58 (2020), <https://doi.org/10.1128/JCM.00690-20>.
- [50] M. Malczynski, N. Dowlow, S. Rezaeian, J. Rios, L. Dirnberger, J.A. Zembower, A. Zhu, C. Qi, Optimizing a real-time PCR assay for rapid detection of *Candida auris* in nasal and axillary/groin samples, *J. Med. Microbiol.* 69 (2020) 824–829, <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001207>.
- [51] Z. Shabaninejad, F. Yousefi, A. Movahedpour, Y. Ghasemi, S. Dokanehiifard, S. Rezaei, R. Aryan, A. Savardashtaki, H. Mirzaei, Electrochemical-based biosensors for microRNA detection: nanotechnology comes into view, *Anal. Biochem.* 581 (2019) 113349, <https://doi.org/10.1016/j.ab.2019.113349>.
- [56] M. Yamamoto, M.M. Alshahni, T. Tamura, K. Satoh, S. Iguchi, K. Kikuchi, M. Mimaki, K. Makimura, Rapid detection of *Candida auris* based on loop-mediated isothermal amplification (LAMP), *J. Clin. Microbiol.* 56 (2018), <https://doi.org/10.1128/JCM.00591-18>.
- [57] R.J. de Oliveira, Stochastic diffusion framework determines the free-energy landscape and rate from single-molecule trajectory, *J. Chem. Phys.* 149 (2018) 234107, <https://doi.org/10.1063/1.5052142>.
- [58] L.M. Sousa, W.A. Souza, D.A. Paixão, R.B. Fazzi, D.Y. Tezuka, C.D. Lopes, Z. A. Carneiro, M.B. Moreira, M. Pivatto, A.V.G. Netto, S. de Albuquerque, F. B. Ferreira, R.J. De Oliveira, J.A.L.C. Resende, R.C. Lino, R.J. De Oliveira Júnior, A. M. Da Costa Ferreira, W. Guerra, DNA binding, cleavage, apoptosis and cytotoxicity studies of three heteroleptic nickel complexes bearing β -diketones, *Inorg. Chim. Acta.* 511 (2020), 119824, <https://doi.org/10.1016/j.ica.2020.119824>.
- [59] J.M.R. Flauzino, R.C.S. Peres, L.M. Alves, J.G. Vieira, J.G. dos Santos, A.G. Brito-Madurro, J.M. Madurro, DNA electrochemical biosensor for detection of *Alicyclobacillus acidoterrestris* utilizing Hoechst 33258 as indicator, *Bioelectrochemistry* 140 (2021) 107801, <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2021.107801>.
- [60] F. Silva, S. Vieira, L. Goulart, J. Boodts, A. Brito-Madurro, J. Madurro, Electrochemical investigation of oligonucleotide-DNA hybridization on poly(4-methoxyphenethylamine), *Int. J. Mol. Sci.* 9 (2008) 1173–1187, <https://doi.org/10.3390/ijms9071173>.
- [61] I. Piroeva, S. Atanassova-Vladimirova, L. Dimowa, H. Sbirkova, G. Radoslavov, P. Hristov, B.L. Shivachev, A simple and rapid scanning electron microscope preparative technique for observation of biological samples: application on bacteria and DNA samples, *Bulg. Chem. Commun.* (2013).
- [62] R. Bjugn, P.R. Flood, Scanning electron microscopy of human urine and purified tamm-horsfall's glycoprotein, *Scand. J. Urol. Nephrol.* 22 (1988) 313–315, <https://doi.org/10.3109/00365598809180806>.
- [63] O. Corduneanu, A.-M. Chiorcea-Paquim, V. Diclescu, S.M. Fiuza, M.P.M. Marques, A.M. Oliveira-Brett, DNA interaction with palladium chelates of biogenic polyamines using atomic force microscopy and voltammetric characterization, *Anal. Chem.* 82 (2010) 1245–1252, <https://doi.org/10.1021/ac902127d>.
- [64] J.M.R. Flauzino, E.L. Pimentel, L.M. Alves, J.M. Madurro, A.G. Brito-Madurro, A novel and reusable electrochemical genosensor for detection of beef adulteration, *Electroanalysis* 33 (2021) 296–303, <https://doi.org/10.1002/elan.202060029>.

**Capítulo 3 - *TRICHOPHYTON RUBRUM* ELECTROCHEMICAL DETECTION
USING 4-AMINOPHENOL AS A NOVEL DNA HYBRIDIZATION INDICATOR**

Capítulo 2 – artigo a ser submetido na revista Biosensor and Bioelectronics

***Trichophyton rubrum* electrochemical detection using 4-Aminophenol as a novel DNA hybridization indicator**

Pedro H G Guedes¹, Dayane D Moraes¹, Jéssica G Brussasco¹, José M R Flauzino¹, Luiz F G Luz¹, Anderson Assunção Andrade², Ronaldo J Oliveira³, João M Madurro⁴, Ana G Brito-Madurro⁵

Affiliations:

¹Institute of Biotechnology, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, Brazil.

²Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Institute of Biological and Natural Sciences, Federal University of Triângulo Mineiro

³Department of Physics, Institute of Exact, Natural Sciences and Education, Federal University of Triângulo Mineiro, Uberaba, Brazil.

⁴Institute of Chemistry, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, Brazil.

⁵Institute of Biotechnology, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, Brazil.

Electronic address: agbrito@ufu.br.

Highlights:

- Novel electrochemical genosensor detects *Trichophyton rubrum* in dermatophytosis using 4-AP indicator.
- Electrochemical biosensor for real-time monitoring of *T. rubrum* in fungal infections.
- Sensitive and specific DNA biosensor distinguishes *T. rubrum* from other pathogens
- Reusable genosensor with 1 pg/μL LOD offers fast, accessible dermatophytosis detection.
- Electrochemical biosensor for point-of-care diagnosis of *T. rubrum* in human dermatophytosis.

Resumo

Dermatofitose é uma infecção fúngica de tecidos queratinizados, como pele, cabelos e unhas. *Trichophyton rubrum* (*T. rubrum*) é um dos principais agentes responsáveis pela maioria das dermatofitoses humanas. Os métodos atuais de diagnóstico do *T. rubrum* exigem a utilização de reagentes em grandes quantidades, mão de obra qualificada, equipamentos caros, alto custo, manutenção lenta, apresentando pontos que podem inviabilizar sua aplicação. Portanto, o desenvolvimento de métodos rápidos, fáceis de entender, acessíveis, sensíveis, seletivos e específicos que proporcionem rápida detecção e monitoramento da doença em tempo real é crucial para a detecção e tratamento. Os genossensores eletroquímicos destacam-se como dispositivos com detecção de DNA por sequência específica, permitindo identificar com precisão patógenos. Neste estudo, um genosensor eletroquímico novo e reutilizável foi desenvolvido para detectar DNA genômico do fungo patogênico *T. rubrum* por voltametria de pulso diferencial, usando detecção indireta monitorando o pico de oxidação de 4-aminofenol (4-AP) como um novo indicador de hibridização de DNA. O genosensor apresentou uma resposta linear a diferentes concentrações de gDNA de *T. rubrum* variando de 10^{-9} g μL^{-1} a 10^{-13} μL^{-1} e o limite de detecção foi de 1 pg μL^{-1} . O genosensor distinguiu o gDNA de patógenos fúngicos inespecíficos do gDNA de *T. rubrum*. As análises morfológicas foram realizadas por microscopia eletrônica de varredura e microscopia de força atômica, que evidenciaram estruturas filamentosas mais heterogêneas na superfície de Au/TR1S:T. gDNA de rubrum comparado ao controle negativo (Au/TR1S).

Palavras chaves: Biossensor eletroquímico, biossensor de DNA, infecção fúngica, *T. rubrum*.

Abstract

Dermatophytosis is a fungal infection of keratinized tissues, such as skin, hair, and nails. *Trichophyton rubrum* (*T. rubrum*) is one of the main agents responsible for most human dermatophytosis. The current methods of diagnosing *T. rubrum* require the use of reagents in large quantities, skilled labor, expensive equipment, high-

cost, slow maintenance, presenting points that may make their application unfeasible. Therefore, the development of fast, easy-to-understand, accessible, sensitive, selective, specific methods that provide rapid detection and monitoring of the disease in real-time is crucial for the detection and treatment. Electrochemical genosensors stand out as devices with sequence-specific DNA detection, allowing them to precisely identify pathogens. In this study, a novel and reusable electrochemical genosensor was developed to detect genomic DNA of the pathogenic fungus *T. rubrum* by differential pulse voltammetry, using indirect detection by monitoring 4-aminophenol (4-AP) oxidation peak as a novel DNA hybridization indicator. The genosensor presented a linear response to different *T. rubrum* gDNA concentrations ranging from 10^{-9} g μL^{-1} to 10^{-13} μL^{-1} and the limit of detection was 1 pg μL^{-1} . The genosensor distinguished non-specific fungi pathogens gDNA from *T. rubrum* gDNA. Morphological analyses were performed by scanning electron microscopy and atomic force microscopy, which showed more heterogeneous filamentous structures on the surface of Au/TR1S:*T. rubrum* gDNA compared to negative control (Au/TR1S).

Keywords: electrochemical biosensor; DNA biosensor; fungal infection, *T. rubrum*.

1. Introduction

Dermatophytosis are fungal infections of keratinized tissues, such as skin, hair and nails. Filamentous fungi use keratin of these tissues as a source of nutrients [1]. This group of fungi represents 45 species grouped into three genera: *Trichophyton*, *Microsporum* and *Epidermophyton*. Among the agents, the most common is *Trichophyton rubrum* (*T. rubrum*). *T. rubrum* is one of the main agents that infect humans, being responsible for most human dermatophytosis [2]. Dermatophytes thrive in temperatures of 25-28°C and human skin infection keeps them in warm, humid conditions. Thus, superficial fungal infections are relatively common in tropical countries [3].

The most recurrent affected regions consist of the skin without or with few hairs, characterized by reddish, scaly, lacy or drawn lesions, isolated or confluent

[2,4,5]. In addition, people with diabetes mellitus should pay attention to the health of their feet and avoid intertrigo, which can lead to bacterial infections in the soft tissue of the legs and feet, causing erysipelas (skin infection) that can cause the loss of the limb [6,7].

The main method of diagnosing *T. rubrum* is performing biological assays such as Polymerase Chain Reaction (PCR) [4] observation of macroscopic and microscopic characteristics which are unique to this fungus, such as mycological assays and the use of microscopes to identify the morphology of the fungus, for example: Disk diffusion method, dilution method in microbroth and colorimetric MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) assay [8]. However, microbiological tests require the use of reagents in large quantities, skilled labor, expensive equipment, high-cost, slow maintenance, presenting points that may make their application unfeasible [9]. The development of fast, easy-to-understand, accessible, sensitive, selective, specific methods that provide rapid detection and monitoring of the disease in real time is crucial for the detection and treatment. Especially for detecting pathogenic fungi such as *T. rubrum*.

One of the most recent techniques to detect pathogens is the development of biosensors [10]. Among biosensors, electrochemical genosensors stand out as devices with sequence-specific DNA detection, allowing them to precisely identify pathogens [11]. Biosensors have advantages such as specificity, sensitivity, speed, precision, miniaturization and potential for portability, simplicity and low cost, demonstrating that biosensors are promising alternatives to conventional analytical methodologies [12]. Electrochemical genosensors can perform complementary target detection and hybridization using direct or indirect technique [13]. Direct detection, the hybridization process is directly converted into an electrical signal or indirectly, using electroactive compounds that interact with the genetic material, enabling the detection of the specific sequence or monitoring of the integrity of the biomolecule [14,15].

Aminophenols are promising chemical compounds in electrochemical studies, since they have two different substituent groups on the aromatic ring, which are both chemically and electrochemically active [13]. 4-Aminophenol (4-AP) is

commonly used as a monomer or as a polymer [16] on the surface of the electrode, modifying it so that this compound improves the electrochemical response of a biosensor [17]. However, 4-AP has not been applied yet as a DNA hybridization indicator for the identification of pathogenic fungi, such as *T. Rubrum*.

Therefore, in this study, it is reported a novel and reusable electrochemical genosensor developed in order to detect genomic DNA of the pathogenic fungus *T. rubrum* by differential pulse voltammetry, using indirect detection by monitoring 4-AP oxidation peak as a novel DNA hybridization indicator.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Reagents and instrumentations

All chemical reagents used in this work presented analytical grade with no prior purification. To prepare all solutions, high purity water (18.2 MΩ cm, Master System, Gehaka, Brazil) was used and deoxygenated by using ultra-pure nitrogen bubbling before electrochemical measurements. Sulfuric acid (98%, H₂SO₄) was acquired from Sigma-Aldrich and potassium chloride (99%, KCl) from Neon. Dibasic sodium phosphate (99%, Na₂HPO₄), monobasic sodium phosphate (99%, NaH₂PO₄) were purchased from Synth and 4-Aminophenol from Sigma-Aldrich.

DNA probe TR1S (Thiol-CTGCCCATTCGCCTAGGAAGCCGG) was designed specifically for *T. rubrum* genomic DNA detection using the National Center for Biotechnology Information (NCBI) data bank and purchased from Exxtend. A TR1S stock solution was prepared using deionized water (1 mmol L⁻¹).

In order to simulate a real positive sample, a healthy human nail scraping was collected from a researcher from the research group and diluted in PBS solution (0.1 mol L⁻¹, pH 7.4) and enriched with *T. rubrum* genomic DNA. *Candida albicans* and *Candida auris* genomic DNA were used as negative control samples to perform selectivity tests.

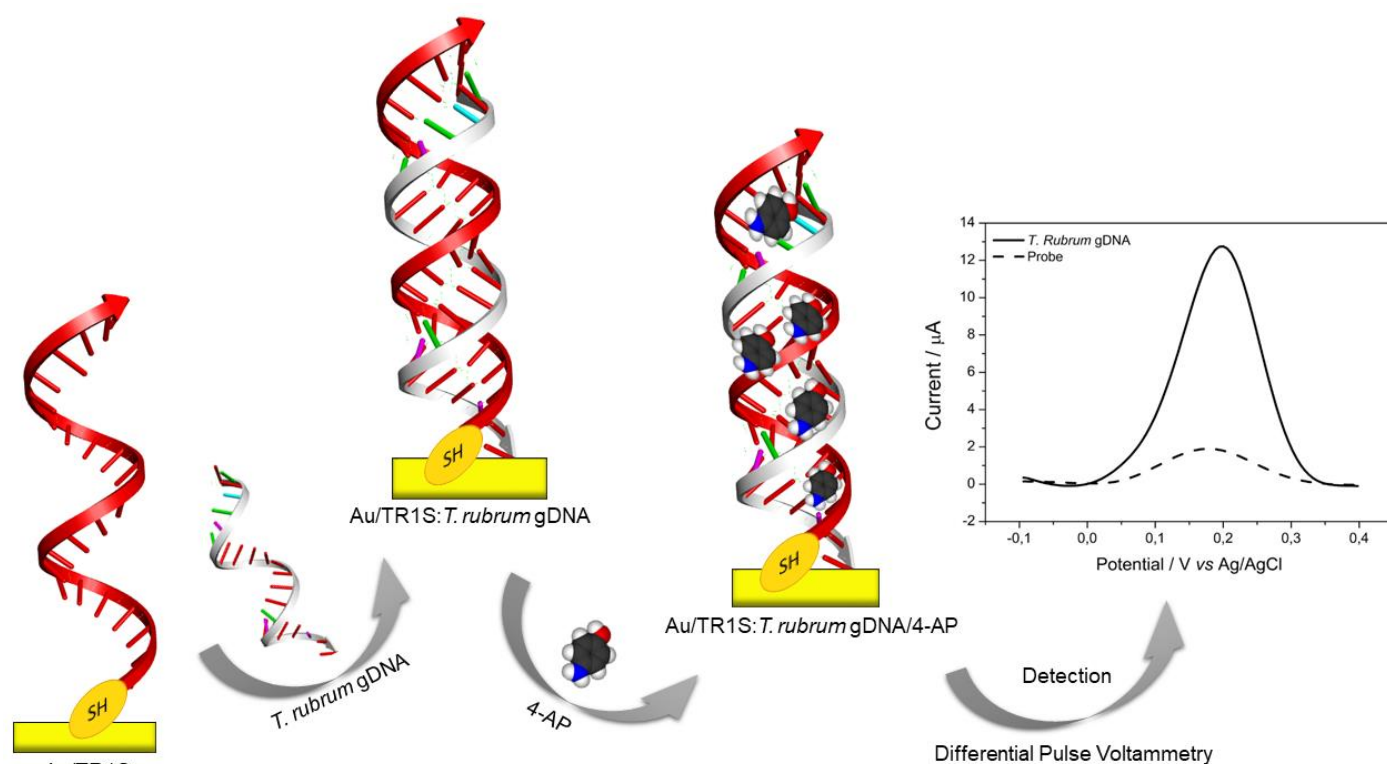
2.2 Fabrication of genosensor for *T. rubrum* gDNA detection

Prior to use, gold electrodes (Au) were immersed in an ethanol solution (70%), followed by 10 minutes ultrasonication. Mechanical polishing was performed using alumina slurry (0.3 μm). In order to eliminate any alumina slurry onto the electrodes surface, Au were immersed in deionized water and sonicated for 2 minutes. Electrochemically preconditioning was carried out using cyclic voltammetry in H_2SO_4 (0.5 mol L^{-1}), 6 cycles with potential ranging from 0.0 V to +1.4 V, 50 mV s^{-1} .

TR1S DNA probe immobilization was performed by dripping 3.0 μL of TR1S (20 $\mu\text{mol L}^{-1}$), followed by 30 min incubation. After this step, Au/TR1S was immersed in PBS solution (0.1 mol L^{-1} , pH 7.4) in order to wash out non-adsorbed TR1S DNA probe.

Hybridization process was carried out by dripping 5 μL of target solution containing nail scraping enriched with *T. rubrum* genomic DNA onto the Au/TR1S surface. Then, Au/TR1S:*T. rubrum* genomic DNA were maintained at 55 $^{\circ}\text{C}$ for 20 minutes, followed by a washed out procedure in order to remove the non-unbound *T. rubrum* genomic DNA solution. Indirect detection was carried out by dripping 5 μL of 4-AP (100 mmol L^{-1}) solution onto Au/TR1S:*T. rubrum* gDNA surface for 10 minutes at room temperature. Au/TR1S:*T. rubrum* gDNA/4-AP was washed out before electrochemical detection.

Electrochemical measurements were carried out by using differential potential voltammetry (DPV) in a potentiostat CHI 760C (CH Instruments, USA) with the following parameters: scan rate 30 mV s^{-1} ; modulation amplitude 60 mV; interval time 0.2 s using as electrolyte PBS solution (0.1 mol L^{-1} , pH 7.4) and potential scan from -0.2 V to +0.55 V and the oxidation peak of 4-AP (100 mmol L^{-1}) was monitored. Each step for the genosensor fabrication is presented in Scheme 1.



Scheme 1. The stages of development of the genosensor

2.3 Computational protocol

The nucleotide sequence of the DNA probe (TR1S) was submitted to the 3DNA (w3DNA) web server [18] that created the double-helices initial conformation of the probe-target biomolecule. This initial structure of the TR1S:*T. rubrum* gDNA was used as the starting point to create the molecular dynamic files on the Solution Builder module of CHARMM-GUI web server [19]. It was applied default parameters to read the initial conformaion, to solvate the simulation box and to set up the periodic boundary conditions. KCL was added at the concentration of 0.1 molar that also neutralized net DNA charges. This aqueous environment was simulated on the GROMACS package version 2023.1 for GPUs [20]. The molecular dynamics step consisted in minimization to remove bad contacts, equilibration in constant volume and temperature and a 10-ns production run. The final dsDNA conformation was conducted to docking studies with 4-Aminophenol in the Genetic Optimization for Ligand Docking (GOLD) suit version 2023 [21]. PyMOL (<https://pymol.org>)

visualized the system and ProteinsPlus web server identified the interactions between the dsDNA and the hybridization indicator. This computational protocol was based in previous studies [22,23, 24].

2.4 Calibration curve and Interference assay

The genosensor analytical performance was evaluated by constructing a calibration curve varying the *T. rubrum* gDNA concentration (10^{-9} g μL^{-1} , 10^{-10} g μL^{-1} , 10^{-11} g μL^{-1} , 10^{-12} g μL^{-1} , 10^{-13} g μL^{-1}). The limit of detection (LOD) was obtained by the lowest concentration detected by indirect detection using DPV in PBS solution (0.1 mol L^{-1} , pH 7.4), monitoring 4-AP oxidation peak.

Purified *T. rubrum* gDNA (10 pg μL^{-1}) and healthy human nail scraping diluted in PBS solution (0.1 mol L^{-1} , pH 7.4) enriched with *T. rubrum* gDNA sample (En) were tested using indirect detection by DPV in PBS solution (0.1 mol L^{-1} , pH 7.4). The electrochemical response was observed and compared in order to confirm no nail scraping interference in the biosensor performance.

2.5 Specificity, regeneration and stability of the genosensor

The genosensor specificity was assessed by using the same nail scraping solution enriched with other gDNA from different fungi (*C. albicans* and *C. auris*) at the same concentration of *T. rubrum* gDNA sample (1 ng μL^{-1}). DPV measurements were carried out and 4-AP oxidation peak was monitored.

Regeneration assay was carried out immediately after the first detection round. Au/TR1S:*T. rubrum* gDNA/4AP were submitted to a washing procedure in PBS solution (0.1 mol L^{-1} , pH 7.4) during 30 seconds of immersion under agitation. Then, the electrodes were immersed in water and submitted to a thermal treatment at 90 °C for 5 min in order to de-hybridize the target (*T. rubrum* gDNA). Subsequently, 4-AP oxidation peak was monitored by DPV measurements recorded before and after Au/TR1S hybridization process with the same concentration of *T. rubrum* gDNA. This procedure was repeated 7 times.

To evaluate the stability, the genosensor (Au/TR1S) was conditioned at 8°C

in airtight containers. DPV measurements were recorded after hybridization of *T. rubrum* gDNA, monitoring 4-AP oxidation peak up to about 70 days.

2.6 Morphological analysis

Morphological analyses were performed using scanning probe microscopy (Model 5100 N, Hitachi) using the dynamic force microscope (DFM) mode. In addition, scanning electron microscopy (SEM) on an EVO MA10 Zeiss microscope analyses from the electrodes surface were obtained.

2.7 Statistics and data presentation

Numeric results are addressed as the arithmetic mean value $\pm$ standard deviation for triplicate measurements. Histogram graphs and voltammograms were plotted using Origin 7 after baseline subtraction.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Computational analysis of aminophenol as DNA hybridization indicator

In order to analyze interactions of single and double-stranded DNA with 4-AP, molecular dynamics studies followed by docking simulations were performed as shown in Figure 1.

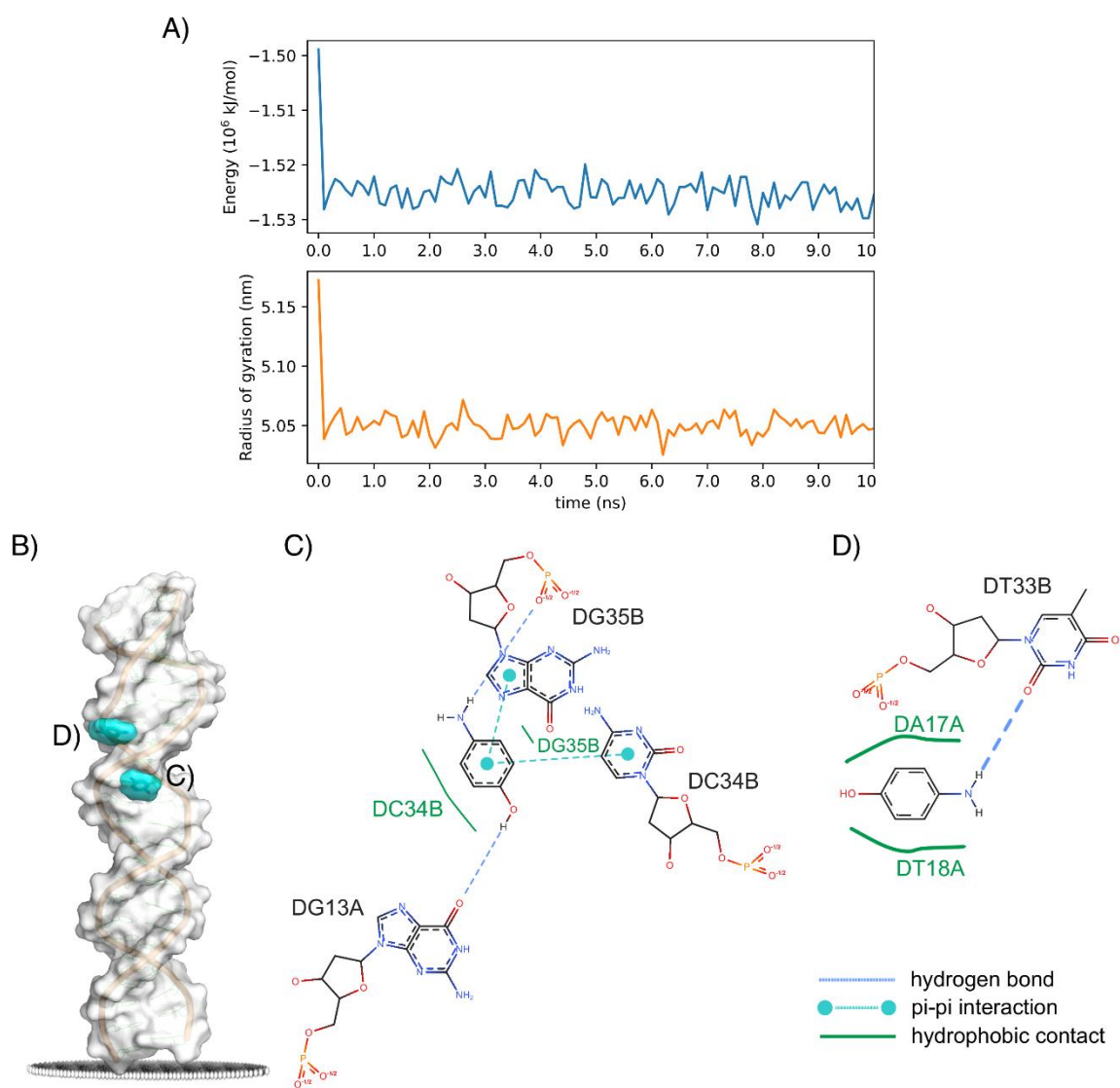


Fig. 1. Computational analysis of the interactions between the hybridization indicator 4-Aminophenol and the double stranded-DNA (TR1S:gDNA). A) The potential energy of the simulated system (top) and the radius of gyration (bottom) as a function of the molecular dynamic time. B) The final simulated conformation of the dsDNA docked with 4-AP (cyan). In B), it is shown the best ranked conformation bound on each the two identified binding cavities. C) and D) show the projections of the DNA-ligand interactions in a two-dimensional view. Hydrophobic contacts are in green, hydrogen bonds in blue and π - π interactions in cyan.

It was performed modelling of the double strands comprising the probe DNA (TR1S) and the target *T. rubrum* gDNA and its hybridization was indicated by interactions with 4-Aminophenol. Figure 1A shows the molecular dynamic simulation of the dsDNA by following the 10-ns time-series along energy and radius of gyration. Both curves displayed a stable conformational ensemble for the modeled double strands that relaxed its initial conformation to a slightly shorter structure with the energy converged to an average around -1.53 kJ/mol. These quantities presented in Figure 1A are consistent with previous reports of similar dsDNA genosensor [24].

The final conformation of the trajectory in Figure 1A was used for the interaction studies of the probe-target dsDNA with the hybridization indicator. Figure 1B shows the molecular docking predictions of the binding mode of 4-AP with TR1S:gDNA. It was found two main sites on the DNA for binding of the 4-AP ligand that are pictured in the DNA structure of Figure 1B. One binding site was predicted to be in a major groove C-G rich region (C in Figure 1B) and the other in a minor groove A-T region (D in Figure 1B). Figure 1C and D projects in a two-dimensional plot the main interactions between the best ranked solutions of each binding cluster in Figure 1B. Both binding cavities stabilized the compound by hydrogen bonds and hydrophobic contact interactions, with the binding site in Figure 1C also displaying extra p-p interactions. It was estimated the free energy of binding by the ChemScore function of GOLD [21] resulting in energies between -8 and -15 kcal/mol, which is in consonant with predicted binding energies from other reports [25,26].

3.2 Calibration curve

T. rubrum can promote infections in different parts of the body, including nail dermatophytosis [4]. Therefore, healthy human nail scraping was diluted in PBS solution (0.1 mol L^{-1} , pH 7.4), then enriched with different concentrations of *T. rubrum* gDNA in order to evaluate the genosensor's sensibility.

A calibration curve was constructed for the Au/TR1S genosensor using indirect detection, monitoring 4-AP oxidation peak by DPV. Figure 2 shows voltammograms for indirect detection of *T. rubrum* gDNA, varying its gDNA concentration ($10^{-9} \text{ g } \mu\text{L}^{-1}$, $10^{-10} \text{ g } \mu\text{L}^{-1}$, $10^{-11} \text{ g } \mu\text{L}^{-1}$, $10^{-12} \text{ g } \mu\text{L}^{-1}$, $10^{-13} \text{ g } \mu\text{L}^{-1}$).

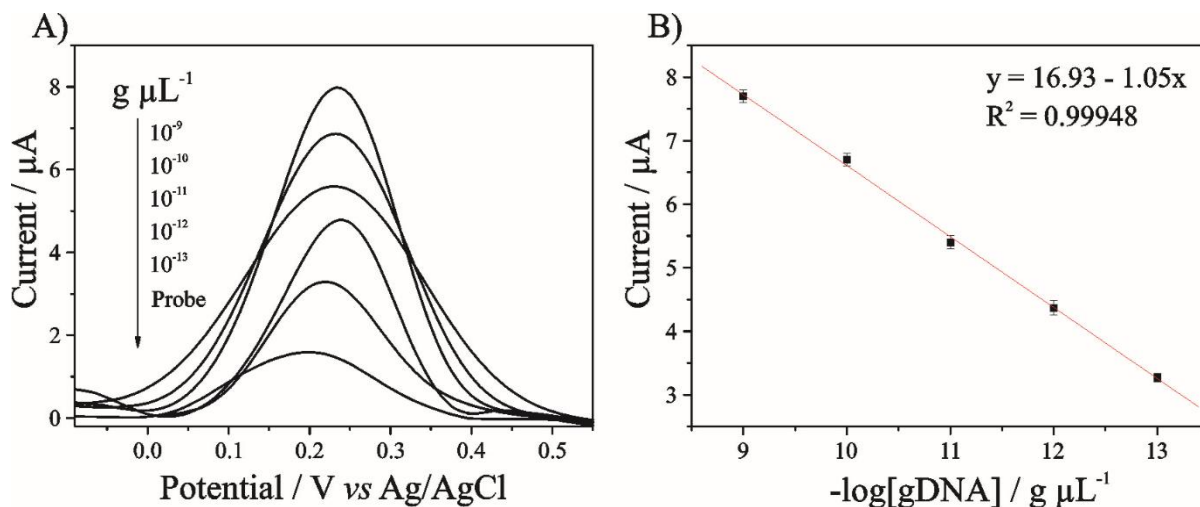


Fig. 2. Electrochemical response for indirect detection of *T. rubrum* gDNA enriched with nail scraping added in PBS solution (0.1 mol L^{-1} , pH 7.4) varying gDNA concentration ($10^{-9} \text{ g } \mu\text{L}^{-1}$, $10^{-10} \text{ g } \mu\text{L}^{-1}$, $10^{-11} \text{ g } \mu\text{L}^{-1}$, $10^{-12} \text{ g } \mu\text{L}^{-1}$, $10^{-13} \text{ g } \mu\text{L}^{-1}$) and the calibration curve. A) Differential pulse voltammograms performed in PBS solution (0.1 mol L^{-1} , pH 7.4); potential scan from -0.2 V to $+0.55 \text{ V}$; scan rate 30 mV s^{-1} ; modulation amplitude 60 mV ; interval time 0.2 s . B) Calibration plots for the electrochemical response.

4-AP was used as a novel DNA hybridization indicator for *T. rubrum* gDNA detection. It was observed that 4-AP oxidation peak $E_p = +0.2 \text{ V}$ (vs. Ag/AgCl (KCl 3.0 mol L^{-1})) increases as well as the *T. rubrum* gDNA concentration increases, suggesting that 4-AP presented a more favourable interaction with the double stranded-DNA (Au/TR1S:gDNA) than single-stranded DNA by monitoring its oxidation peak, according to Fig. 2A, corroborating with the theoretical results obtained by the modeling previously indicated in item 3.1.

This DNA hybridization behaviour can also be observed when monitoring ethidium bromide oxidation peak $E_p = +0.64 \text{ V}$ (vs. Ag / AgCl / Cl^- (KCl 3.0 mol L^{-1})) [27]. It is well known in the literature that plane aromatic cations intercalate between the paired nitrogenous bases of the DNA duplex by van der Waals interactions in

hydrophobic pockets [28], so their concentration is proportional to the amount of double-stranded DNA, which corresponds to the target DNA hybridized with the probe DNA. According to the results, 4-aminophenol has a similar behavior, probably due to its aromatic nature and being a flat molecule.

4-AP presents a low required oxidation potential $E_p = +0.2$ V (vs. Ag / AgCl / Cl^- (KCl 3.0 mol L⁻¹) which is an attractive alternative for an electrochemical DNA hybridization indicator. Fig 2B shows that the genosensor presented a linear response to different *T. rubrum* gDNA concentrations ranging from 10⁻⁹ g μ L⁻¹ to 10⁻¹³ μ L⁻¹. The calibration curve presented the equation $i_p (\mu A) = 16.93 - 1.05x (\mu A / g \mu L^{-1}) * (-\log[gDNA]) (g \mu L^{-1})$ with $R^2 = 0.99848$ and the limit of detection was 1 pg μ L⁻¹.

3.3 Interference assay

Dealing with nail scraping samples to identify *T. rubrum* gDNA is challenging due to nail's hardness characteristic [1]. For this reason, an interference assay was performed in order to evaluate the electrochemical response by monitoring 4-AP oxidation of the samples containing only purified *T. rubrum* gDNA and with nail scraping enrichment (En). The results are presented in Fig.3.

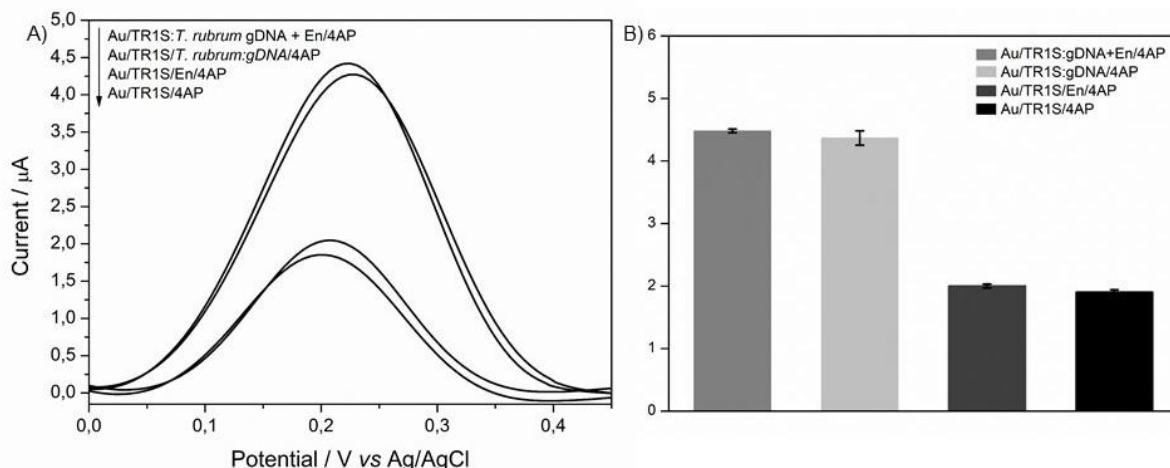


Fig.3. A) Differential pulse voltammograms of *T. rubrum* gDNA indirect detection, monitoring 4-AP oxidation. Fig. 3B presents histogram of i_p for *T. rubrum* indirect detection of purified B) or nail scraping enrichment. Parameters: potential scan from

-0.2 V to +0.55 V; scan rate 30 mV s⁻¹; modulation amplitude 60 mV; interval time 0.2 s. Oxidation peak of 4-AP was monitored.

Electrochemical measurements showed that Au/TR1S/4-AP presented a current response of 1.9 ± 0.095 and after the enrichment (Au/TR1S/En/4-AP) was $i_p = 1.9 \pm 0.003 \mu\text{A}$. In addition, Au/TR1S:gDNA/4-AP presented $i_p = 4.3 \pm 0.215 \mu\text{A}$ while after the enrichment (Au/TR1S:gDNA+En/4-AP) was $i_p = 4.3 \pm 0.172 \mu\text{A}$ as observed in

Fig. 3B. Therefore, samples containing nail scraping enrichment presented no significant difference in electrochemical response compared to the purified *T. rubrum* gDNA sample detection.

3.4 Selectivity, regeneration and stability assays

Selectivity, regeneration and stability assays are crucial towards developing a point of care genosensor. These parameters were evaluated by monitoring current response of 4-AP oxidation as shown in Fig. 4.

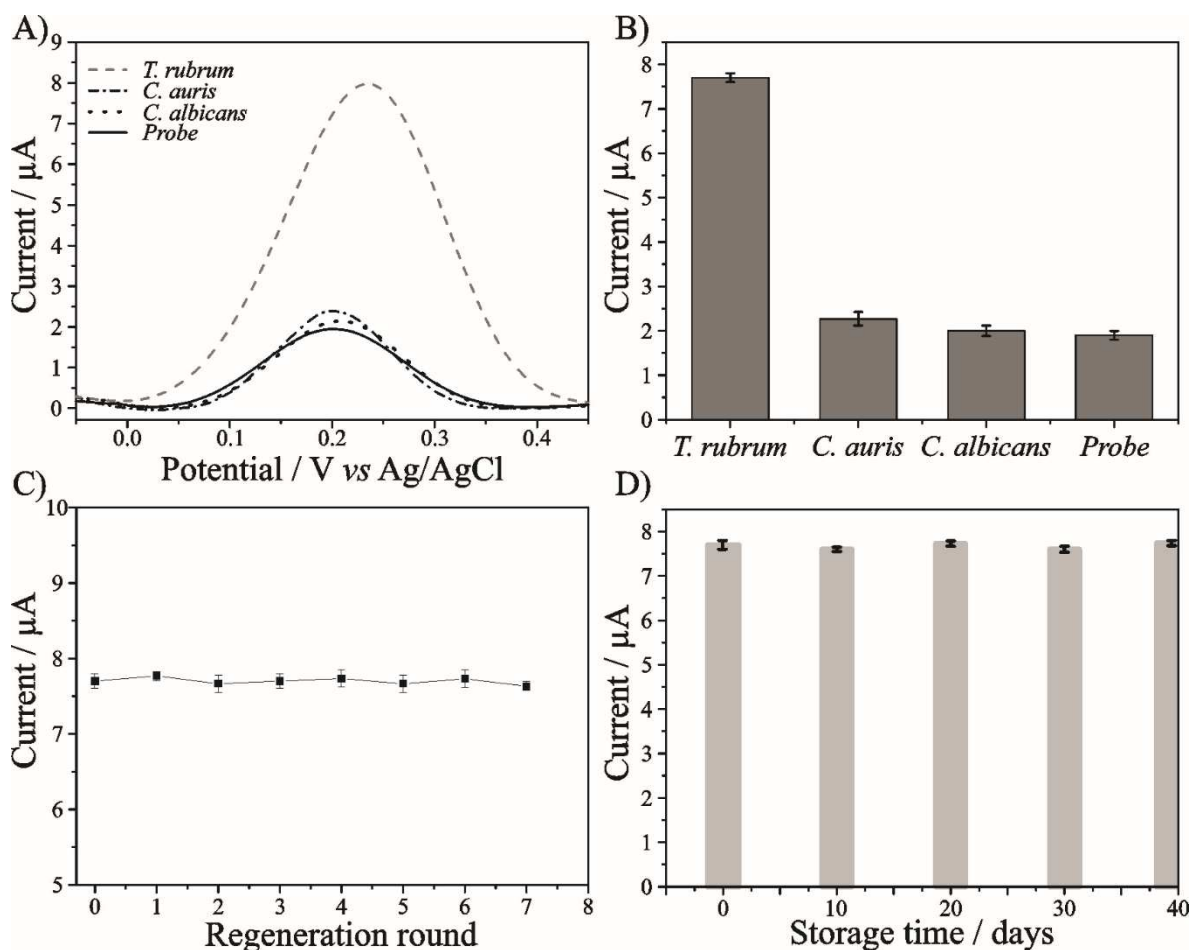


Fig. 4. A) Differential pulse voltammograms and B) histogram of i_p value for the detection of *T. rubrum*, *C. albicans* and *C. auris* gDNA by monitoring 4-AP oxidation. C) Relation between i_p value and 7 regeneration rounds. D) Relation between i_p and storage time. Parameters: potential scan from -0.2 V to +0.55 V; scan rate 30 mV s^{-1} ; modulation amplitude 60 mV; interval time 0.2 s. Oxidation peak of 4-AP was monitored.

The selectivity of the bioelectrode (Au/TR1S) was evaluated by comparing the current response of 4-AP oxidation after Au/TR1S was sensitized with *T. rubrum*, *C. albicans* and *C. auris* gDNA at the same concentration ($1 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$) since they can also be found in scraping nails samples ($1 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$). The current responses for *T. rubrum*, *C. auris*, *C. albicans* gDNA are, respectively, $i_p = 7.7 \pm 0.1 \text{ } \mu\text{A}$; $i_p = 2.3 \pm 0.1$

μA and $i_p = 2.0 \pm 0.1 \mu\text{A}$. A decrease in current response was observed for *C. albicans* (3.3-fold) and *C. auris* (3.8-fold) of gDNA detection compared to *T. rubrum* ($i_p = 7.7 \pm 0.1 \mu\text{A}$) current response. The genosensor distinguished non-specific fungi pathogens gDNA from *T. rubrum* gDNA, according to Fig.4 A) and B).

3.5 Morphological assays

Morphological analyses were performed by scanning electron microscopy and atomic force microscopy. The results are presented in Fig. 5.

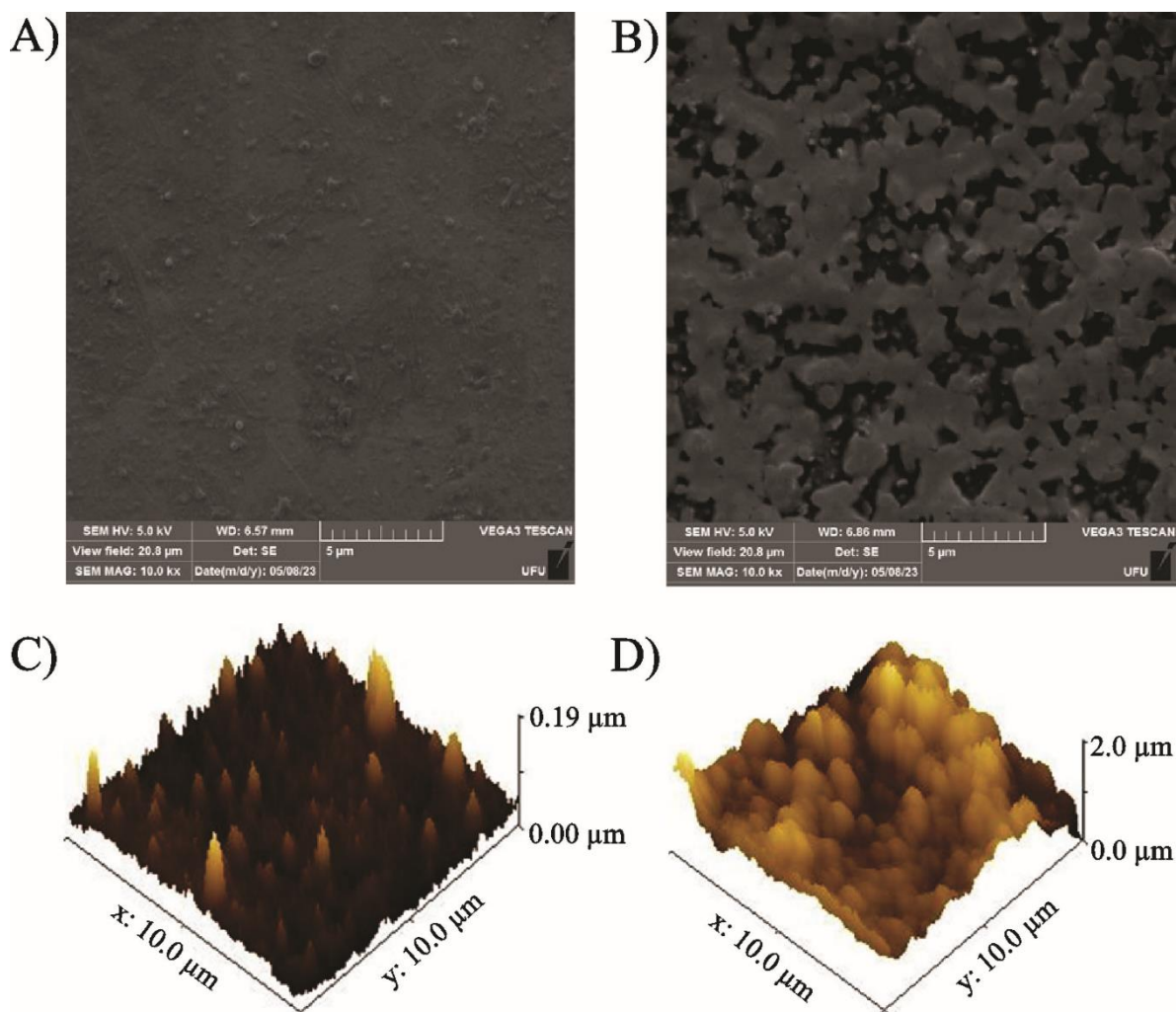


Fig. 5 shows different morphologies between bioelectrodes surface before (Au/TR1S) and after adding the target (Au/TR1S:*T. rubrum* gDNA) captured by MEV

(A, B) and AFM (C, D) analyses.

Scanning electron microscopy images show more heterogeneous filamentous structures on the surface of Au/TR1S:*T. rubrum* gDNA compared to negative control (Au/TR1S), according to Fig 5A and B. These results can be explained by the fact that after biosensor exposed to *T. rubrum* gDNA target, a more static ds-DNA was formed [24] promoting a more heterogeneous structure formation on the electrodes surface. Considering that atomic force microscopy is as a valuable technique for assessing DNA hybridization on solid surfaces [29], AFM analyses showed coefficients of roughness $R_q = 12.2 \pm 0.03$ nm and $R_q = 200 \pm 0.11$ nm for Au/TR1S and Au/TR1S:*T. rubrum* gDNA, respectively, according to Fig 5C and D. Au/TR1S:*T. rubrum* gDNA presented a 16-fold increase in the coefficient of roughness value compared to negative control Fig. In addition, more smoothed and sparse point structures were observed in Au/TR1S (Fig. 5C) while Au/TR1S:*T. rubrum* gDNA presented more prominent wavy-like structures on the electrode surface due to the DNA hybridization formation (Fig. 5D). These results corroborate with SEM images and this pattern was also observed in other genosensors [30,31].

4. CONCLUSIONS

This study developed a novel and reusable electrochemical genosensor to detect genomic DNA of the pathogenic fungus *T. rubrum* using 4-AP oxidation peak as a novel DNA hybridization indicator. The genosensor presented a linear response to different *T. rubrum* gDNA concentrations ranging from 10^{-9} g μL^{-1} to 10^{-13} μL^{-1} , with a limit of detection of 1 pg μL^{-1} . The genosensor distinguished non-specific fungi pathogens gDNA from *T. rubrum* gDNA. Morphological analyses were performed by scanning electron microscopy and atomic force microscopy, which showed more heterogeneous filamentous structures on the surface of Au/TR1S:*T. rubrum* gDNA compared to negative control (Au/TR1S). The study provides a promising alternative to conventional analytical methodologies for the detection and treatment of dermatophytosis caused by *T. rubrum*.

ACKNOWLEDGMENTS

Financial support was provided by the Brazilian agencies Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, APQ-02303-21) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, 312328/2019-2). Computational resources were provided by the Núcleo de Computação Científica da Universidade do Estado de São Paulo (NCC/GridUnesp) and the Centro Nacional de Processamento de Alto Desempenho in São Paulo (CENAPAD-SP).

5. REFERENCES

1. Aboul-Ella, H., Sayed, R.H., Abo-Elyazeed, H.S., 2023. Development, preparation, and evaluation of a novel dotted lateral flow immunochromatographic kit for rapid diagnosis of dermatophytosis. *Sci. Rep.* 13, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-27443-4>
5. Zhang, R., Zhao, J., Li, L., 2023. Metabolic phenotype analysis of *Trichophyton rubrum* after laser irradiation. *BMC Microbiol.* 23, 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12866-023-02759-3>
6. Chowdhary, A., Singh, A., Kaur, A., Khurana, A., 2022. The emergence and worldwide spread of the species *Trichophyton indotineae* causing difficult-to-treat dermatophytosis: A new challenge in the management of dermatophytosis. *PLoS Pathog.* 18, 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010795>
7. Norimatsu, Yuta, Norimatsu, Yurie, 2022. A severe case of *Trichophyton rubrum*-caused dermatomycosis exacerbated after COVID-19 vaccination that had to be differentiated from pustular psoriasis. *Med. Mycol. Case Rep.* 36, 19–22. <https://doi.org/10.1016/j.mmcr.2022.03.001>
8. Zamani, M., Robson, J.M., Fan, A., Bono, M.S., Furst, A.L., Klapperich, C.M., 2021. Electrochemical Strategy for Low-Cost Viral Detection. *ACS Cent. Sci.* 7, 963–972. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.1c00186>
9. Cañete-Gibas, C., Wiederhold, N.P., 2023. Mycology of Onychomycosis. *Clin. Microbiol. Newsl.* 45, 11–17. <https://doi.org/10.1016/j.clinmicnews.2023.01.002>
10. Ekeng, B.E., Kibone, W., Itam-Eyo, A.E., Bongomin, F., 2022. Onychomycosis in Patients with Diabetes Mellitus in Africa: A Global Scoping Review, 2000–2021. *Mycopathologia* 188, 173–182. <https://doi.org/10.1007/s11046-022-00660-7>

11. Safi-Samghabadi, A., Atyabi, S.M., Razzaghi-Abyaneh, M., 2022. Anti-dermatophytic activity of cold atmospheric plasma against *Trichophyton rubrum* via affecting fungal growth, morphology, drug susceptibility and HSP90 gene expression. *Sci. Rep.* 12, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-13828-4>
9. Ariffin, Z.Z., Saat, M.N., Zulkifle, N.T., 2022. A Review on Response Surface Methodology Optimization in Microbial Biotransformation. *Sci. Lett.* 16, 64–72. <https://doi.org/10.24191/sl.v16i2.17135>
10. Verma, D., Singh, K.R., Yadav, A.K., Nayak, V., Singh, J., Solanki, P.R., Singh, R.P., 2022. Internet of things (IoT) in nano-integrated wearable biosensor devices for healthcare applications. *Biosens. Bioelectron.* X 11. <https://doi.org/10.1016/j.biosx.2022.100153>
11. Zheng, Y., Karimi-Maleh, H., Fu, L., 2022. Advances in Electrochemical Techniques for the Detection and Analysis of Genetically Modified Organisms: An Analysis Based on Bibliometrics. *Chemosensors* 10. <https://doi.org/10.3390/chemosensors10050194>
12. Ramesh, M., Janani, R., Deepa, C., Rajeshkumar, L., 2022. Nanotechnology-Enabled Biosensors: A Review of Fundamentals, Design Principles, Materials, and Applications. *Biosensors* 13, 40. <https://doi.org/10.3390/bios13010040>
13. de Castro, A.C.H., Kochi, L.T., Flauzino, J.M.R., Soares, M.M.C.N., Alves, V.A., da Silva, L.A., Madurro, J.M., Brito-Madurro, A.G., 2022. Electrochemical Biosensor for Sensitive Detection of Hepatitis B in Human Plasma. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 194, 2604–2619. <https://doi.org/10.1007/s12010-022-03829-4>
14. Garcia-Melo, L.F., Chagoya Pio, N.A., Morales-Rodríguez, M., Madrigal-Bujaidar, E., Madrigal-Santillán, E.O., Álvarez-González, I., Pineda Cruces, R.N., Batina, N., 2023. Detection of the p53 Gene Mutation Using an Ultra-sensitive and Highly Selective Electrochemical DNA Biosensor. *J. Mex. Chem. Soc.* 67, 33–45. <https://doi.org/10.29356/jmcs.v67i1.1880>
15. Hao, J., Wang, Z., Li, Y., Deng, Y., Fan, Y., Huang, Y., 2023. A novel signal amplification strategy for label-free electrochemical DNA sensor based on the interaction between α -cyclodextrin and ferrocenyl indicator. *Bioelectrochemistry* 151, 108373. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2023.108373>
16. Dehdari Vais, R., Heli, H., Sattarahmady, N., Barazesh, A., 2022. A novel and

- ultrasensitive label-free electrochemical DNA biosensor for *Trichomonas vaginalis* detection based on a nanostructured film of poly(ortho-aminophenol). *Synth. Met.* 287, 117082. <https://doi.org/10.1016/j.synthmet.2022.117082>
17. Saraswat, A., Kumar, S., 2023. A topical study of electrochemical response of functionalized conducting polyaniline: An overview. *Eur. Polym. J.* <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2022.111714>
 18. Li, S., Olson, W.K., Lu, X.J., 2019. Web 3DNA 2.0 for the analysis, visualization, and modeling of 3D nucleic acid structures. *Nucleic Acids Res.* 47, W26–W34. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz394>
 19. Lee, J., Cheng, X., Swails, J.M., Yeom, M.S., Eastman, P.K., Lemkul, J.A., Wei, S., Buckner, J., Jeong, J.C., Qi, Y., Jo, S., Pande, V.S., Case, D.A., Brooks, C.L., MacKerell, A.D., Klauda, J.B., Im, W., 2016. CHARMM-GUI Input Generator for NAMD, GROMACS, AMBER, OpenMM, and CHARMM/OpenMM Simulations Using the CHARMM36 Additive Force Field. *J. Chem. Theory Comput.* 12, 405–413. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00935>
 20. Páll, S., Zhmurov, A., Bauer, P., Abraham, M., Lundborg, M., Gray, A., Hess, B., Lindahl, E., 2020. Heterogeneous parallelization and acceleration of molecular dynamics simulations in GROMACS. *J. Chem. Phys.* 153, 134110. <https://doi.org/10.1063/5.0018516>
 21. Verdonk, M.L., Cole, J.C., Hartshorn, M.J., Murray, C.W., Taylor, R.D., 2003. Improved protein-ligand docking using GOLD. *Proteins Struct. Funct. Genet.* 52, 609–623. <https://doi.org/10.1002/prot.10465>
 22. Alves, L.M., Barros, H.L.S., Flauzino, J.M.R., Guedes, P.H.G., Pereira, J.M., Fujiwara, R.T., Mineo, T.W.P., Mineo, J.R., de Oliveira, R.J., Madurro, J.M., G.Brito-Madurro, A., 2019. A novel peptide-based sensor platform for detection of anti-*Toxoplasma gondii* immunoglobulins. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 175, 112778. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.112778>
 23. Antunes, V.U., Llontop, E.E., Vasconcelos, F.N. da C., López de los Santos, Y., Oliveira, R.J., Lincopan, N., Farah, C.S., Doucet, N., Mittermaier, A., Favaro, D.C., 2019. Importance of the $\beta 5$ – $\beta 6$ Loop for the Structure, Catalytic Efficiency, and Stability of Carbapenem-Hydrolyzing Class D β -Lactamase Subfamily OXA-143.

- Biochemistry 58, 3604–3616. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.9b00365>
24. Guedes, P.H.G., Brussasco, J.G., Moço, A.C.R., Moraes, D.D., Flauzino, J.M.R., Luz, L.F.G., Almeida, M.T.G., Soares, M.M.C.N., Oliveira, R.J., Madurro, J.M., Brito-Madurro, A.G., 2021. Ninhydrin as a novel DNA hybridization indicator applied to a highly reusable electrochemical genosensor for *Candida auris*. *Talanta* 235. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122694>
 25. Pereira, P.H. do N., Lima, J.C., Deflon, V.M., Malpass, G.R.P., De Oliveira, R.J., Maia, P.I.D.S., 2021. Nitroisatin dithiocarbazate: Synthesis, structural characterization, DFT, and docking studies. *Eur. J. Chem.* 12, 235–241. <https://doi.org/10.5155/eurjchem.12.3.235-241.2106>
 26. Sousa, L.M., Souza, W.A., Paixão, D.A., Fazzi, R.B., Tezuka, D.Y., Lopes, C.D., Carneiro, Z.A., Moreira, M.B., Pivatto, M., Netto, A.V.G., de Albuquerque, S., Ferreira, F.B., De Oliveira, R.J., Resende, J.A.L.C., Lino, R.C., De Oliveira Júnior, R.J., Da Costa Ferreira, A.M., Guerra, W., 2020. DNA binding, cleavage, apoptosis and cytotoxicity studies of three heteroleptic nickel complexes bearing β -diketones. *Inorganica Chim. Acta* 511, 119824. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2020.119824>
 27. Oliveira, D.A., Silva, J. V., Flauzino, J.M.R., Castro, A.C.H., Moço, A.C.R., Soares, M.M.C.N., Madurro, J.M., Brito-Madurro, A.G., 2018. Application of nanomaterials for the electrical and optical detection of the hepatitis B virus. *Anal. Biochem.* 549, 157–163. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2018.03.023>
 28. Wilson, W.D., Streckowski, L., Tanious, F.A., Watson, R.A., Mokrosz, J.L., Streckowska, A., Webster, G.D., Neidle, S., 1988. Binding of Unfused Aromatic Cations to DNA. The Influence of Molecular Twist on Intercalation. *J. Am. Chem. Soc.* 110, 8292–8299. <https://doi.org/10.1021/ja00233a003>
 29. Oliveira Brett, A.M., Chiorcea, A.-M., 2003. Atomic Force Microscopy of DNA Immobilized onto a Highly Oriented Pyrolytic Graphite Electrode Surface. *Langmuir* 19, 3830–3839. <https://doi.org/10.1021/la027047d>
 30. Flauzino, J.M.R., Nguyen, E.P., Yang, Q., Rosati, G., Panáček, D., Brito-Madurro, A.G., Madurro, J.M., Bakandritsos, A., Otyepka, M., Merkoçi, A., 2022. Label-free and reagentless electrochemical genosensor based on graphene acid for meat adulteration detection. *Biosens. Bioelectron.* 195.

<https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113628>

31. Guedes, P.H.G., Brussasco, J.G., Moço, A.C.R., Moraes, D.D., Segatto, M., Flauzino, J.M.R., Mendes-Silva, A.P., Vieira, C.U., Madurro, J.M., Brito-Madurro, A.G., 2023. A highly reusable genosensor for late-life depression diagnosis based on microRNA 184 attomolar detection in human plasma. *Talanta* 258, 124342. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2023.124342>