



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

STHEFANY DPAULA ELIAS TORRES GONÇALVES

**GENOSSENSOR IMPEDIMÉTRICO PARA DIAGNÓSTICO
DA ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA BASEADO EM
NANOPARTÍCULAS DE OURO**

Recife
2022

STHEFANY DPAULA ELIAS TORRES GONÇALVES

**GENOSENSOR IMPEDIMÉTRICO PARA DIAGNÓSTICO
DA ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA BASEADO EM
NANOPARTÍCULAS DE OURO**

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

Orientadora: Maria Danielly Lima de Oliveira

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

Gonçalves, Sthefany DPaula Elias Torres.

Genossensor impedimétrico para diagnóstico da esquistossomose mansônica baseado em nanopartículas de ouro / Sthefany DPaula Elias Torres Gonçalves. - Recife, 2022.

57 : il., tab.

Orientador(a): Maria Danielly Lima de Oliveira

Coorientador(a): César Augusto Souza de Andrade

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Biomedicina, 2022.

1. Biossensor. 2. Impedância. 3. Eletroquímica. 4. Microscopia de força atômica. 5. Esquistossomose. I. Oliveira, Maria Danielly Lima de. (Orientação). II. Andrade, César Augusto Souza de. (Coorientação). III. Título.

570 CDD (22.ed.)

STHEFANY DPAULA ELIAS TORRES GONÇALVES

**GENOSENSOR IMPEDIMÉTRICO PARA DIAGNÓSTICO DA
ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA BASEADO EM
NANOPARTÍCULAS DE OURO**

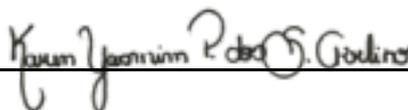
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Biomedicina da Universidade Federal de Pernambuco, como pré-requisito à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Aprovada em: 29/06/2022

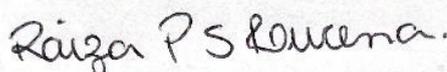
BANCA EXAMINADORA



Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Danielly Lima de Oliveira
Universidade Federal de Pernambuco/Departamento de Bioquímica



Prof^a Dr^a Karen Yasmim Pereira dos Santos Avelino
Universidade Católica de Pernambuco



Ma. Raiza Pereira Santos de Lucena
Universidade Federal de Pernambuco/Departamento de Bioquímica

Este trabalho é dedicado àqueles que me deram todo o suporte para que eu chegasse até aqui, a minha família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me acompanhar em todos os passos dessa jornada e me dar forças e saúde para que meus objetivos fossem alcançados.

Aos meus pais, Cláudia e Marcos e ao meu irmão Philipe, pelo suporte, carinho, incentivo, atenção e paciência durante esses anos. Além deles, à toda minha família que sempre torceu por mim e me apoiou.

À minha orientadora Prof^a Dr^a Maria Danielly pela oportunidade, confiança, disponibilidade, ensinamentos e toda orientação que me fez chegar até aqui.

Ao meu coorientador Prof^o Dr^o César Andrade pelo apoio, oportunidade e conhecimentos compartilhados.

Ao Dr^o Fábio Lopes de Melo pelas amostras fornecidas para a realização deste trabalho.

A todos os membros do Laboratório de Biodispositivos Nanoestruturados pelas trocas de conhecimentos e companheirismo nesses últimos anos.

Aos meus amigos de longa data Lorena, M^a Eduarda, Emily e Vinícius por todos os momentos de descontração e também pela paciência. Por todos os conselhos e suporte que foram essenciais durante a minha trajetória.

Aos meus cachorros, Kiko e Kali, por sempre me receberem com tanto amor e euforia, me dando alegria todos os dias.

Aos amigos que eu fiz durante a minha graduação, sem vocês essa caminhada seria bem mais difícil. Obrigada.

A todos os funcionários do Departamento de Bioquímica.

Ao CNPq pelo fomento na pesquisa.

A Demi Lovato por suas músicas que me ajudaram nos momentos bons, ruins, difíceis e felizes durante vários períodos da minha vida.

E a todos aqueles que eu não citei, mas que contribuíram de alguma forma durante a realização deste projeto.

Obrigada!

Every great dream begins with a dreamer.
Always remember, you have within you the
strength, the patience, and the passion to
reach for the stars, to change the world.

(Harriet Tubman)

GONÇALVES, STHEFANY DPAULA ELIAS TORRES. **GENOSENSOR IMPEDIMÉTRICO PARA DIAGNÓSTICO DA ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA BASEADO EM NANOPARTÍCULAS DE OURO**. 2022. 57 páginas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2022.

RESUMO

A esquistossomose é uma doença infecciosa granulomatosa cujo agente etiológico é o *Schistosoma mansoni*, que coloniza o sistema portal humano. É uma doença tropical negligenciada debilitante, considerada uma das mais graves infecções parasitárias do mundo. Apresentações ectópicas da esquistossomose ocorrem quando os ovos do parasita ou formas adultas estão localizados longe do seu sítio primário de parasitismo (sistema portal), sendo o principal local o Sistema Nervoso Central, resultando na neuroesquistossomose. Quando sintomática, é um grave distúrbio no qual o prognóstico depende em grande parte do diagnóstico e tratamento precoces. Assim, o desenvolvimento de novos métodos diagnósticos para esta doença é de fundamental importância. O presente trabalho teve como objetivo a realização da modificação do eletrodo de ouro através da adsorção química de 3-mercaptopropiltrimetoxisilano (MPTS), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), N-Hidroxisuccinimida (NHS), nanopartículas de ouro (AuNPs) modificadas com ácido mercaptobenzóico (MBA), e sonda de DNA para reconhecimento do genoma de *S. mansoni*. Como forma de otimização da plataforma sensora foi objetivado também a avaliação do sistema nanoestruturado frente a amostras de *Leishmania sp.* A caracterização das etapas de modificação foi realizada através da técnica de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE) e Voltametria Cíclica (VC) e as modificações na superfície do eletrodo foram avaliadas através do microscópio de força atômica com ponta de cantilever. A análise de EIE foi realizada numa faixa de frequência de 100 mHz a 100 kHz, numa amplitude de 10 mV, enquanto a VC, foi realizada com faixa de frequência de - 0,2 a 0,7 V e amplitude 50 mV.s⁻¹, utilizando-se o ferro-ferricianeto de potássio a 10 mM como sonda redox. A EIE revelou que a camada automontada composta por MPTS foi adsorvida adequadamente na superfície do eletrodo, sendo observado um aumento na impedância total do sistema refletido pelo incremento da resistência à transferência de cargas (RCT). Ao ser adicionada a AuNPs, o sistema se tornou mais condutor, ao ser observado um novo aumento do RCT, em seguida um novo aumento do RCT, após a adição da Sonda_{Shi} provou que o sistema MPTS-EDC:NHS-AuNPs-Sonda_{Shi} foi obtido. O VC apresentou variações nas correntes de pico, comprovando a adsorção das camadas MPTS-EDC:NHS-AuNPs-Sonda_{Shi}. Posteriormente, o sistema foi capaz de detectar *S. mansoni* em amostras de pacientes contaminados. Diante disto, foi possível verificar que a plataforma desenvolvida mantém e estabelece um processo de hibridização específico quando exposta ao genoma dos parasitas avaliados. Amostras de soro contaminadas com *S. mansoni* foram avaliadas, certificando que a plataforma é altamente indicada como método de detecção para *S. mansoni* e outras parasitoses como a *Leishmania sp.* Com isto, a plataforma apresenta baixo custo, sensibilidade e especificidade para diagnóstico da esquistossomose, com limite de detecção de 83,95 ng/mL⁻¹ e da Leishmaniose, com limite de 1 pg/mL⁻¹.

Palavras-chave: Biossensor. Neuroesquistossomose. Eletroquímica. Impedância. Microscopia de força atômica.

GONÇALVES, STHEFANY DPAULA ELIASTORRES. **IMPEDIMETRIC GENOSENSOR FOR DIAGNOSIS OF SCHISTOSOMOSIS MANSONIC BASED ON GOLD NANOPARTICLES.** 2022. 57 pages. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2022.

ABSTRACT

Schistosomiasis is an infectious granulomatous disease whose etiologic agent is *Schistosoma mansoni*, which colonizes the human portal system. It is a debilitating neglected tropical disease, considered one of the most serious parasitic infections in the world. Ectopic presentations of schistosomiasis occur when the parasite eggs or adult forms are located far from their primary site of parasitism (portal system), the main site being the Central Nervous System, resulting in neuroschistosomiasis. When symptomatic, it is a serious disorder in which the prognosis largely depends on early diagnosis and treatment. Thus, the development of new diagnostic methods for this disease is of fundamental importance. The present work aimed to carry out the modification of the gold electrode through the chemical adsorption of 3-mercaptopropyltrimethoxysilane (MPTS), 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC), N-Hydroxysuccinimide (NHS), nanoparticles (AuNPs) modified with mercaptobenzoic acid (MBA), and DNA probe to recognize the *S. mansoni* genome. As a way of optimizing the sensor platform, the evaluation of the nanostructured system against *Leishmania* sp. The characterization of the modification steps was performed using Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIE) and Cyclic Voltammetry (VC) and the changes on the electrode surface were evaluated using a cantilever tip atomic force microscope. The EIE analysis was performed in a frequency range of 100 mHz to 100 kHz, in an amplitude of 10 mV, while the VC was performed with a frequency range of -0.2 to 0.7 V and amplitude of 50 mV.s⁻¹, using 10 mM potassium iron ferricyanide as a redox probe. The EIE revealed that the self-assembled layer composed of MPTS was properly adsorbed on the electrode surface, with an increase in the total system impedance reflected by the increase in charge transfer resistance (RCT) being observed. When added to AuNPs, the system became more conductive, as a new increase in RCT was observed, followed by a new increase in RCT, after the addition of Sonda_{Shi}. proved that the MPTS-EDC:NHS-AuNPs-Sonda_{Shi} system was obtained. The VC showed variations in peak currents, proving the adsorption of the MPTS-EDC:NHS-AuNPs-Sonda_{Shi} layers. Subsequently, the system was able to detect *S. mansoni* in samples from infected patients. In view of this, it was possible to verify that the developed platform maintains and establishes a specific hybridization process when exposed to the genome of the evaluated parasites. Serum samples contaminated with *S. mansoni* were evaluated, certifying that the platform is highly indicated as a detection method for *S. mansoni* and other parasites such as *Leishmania* sp. Thus, the platform has low cost, sensitivity and specificity for the diagnosis of schistosomiasis, with a detection limit of 83.95 ng/mL⁻¹ and for Leishmaniasis, with a limit of 1 pg/mL⁻¹.

Key words: Biosensor. Neuroschistosomiasis. Electrochemistry. Impedance. Atomic force microscopy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Ciclo evolutivo do <i>Schistosoma mansoni</i>	18
Figura 2 – Distribuição da esquistossomose mundial	19
Figura 3 – Distribuição da esquistossomose segundo percentual de positividade	20
Figura 4 – Esquema de funcionamento de biossensor para detecção do analito	23
Figura 5 – Representação esquemática de um genossensor	23
Figura 6 – Moléculas passíveis de se ligar à nanopartículas de ouro	26
Figura 7 – Representação de um voltamograma cíclico, em que I _{pa} : corrente de pico anódica, I _{pc} : corrente de pico catódica, E _{pa} : potencial de pico anódico e E _{pc} : potencial de pico catódico	28
Figura 8 – Representação do diagrama de Nyquist	29
Figura 9 – Circuito equivalente de Randles	29
Figura 10 – Esquema de funcionamento do AFM	30
Figura 11 – (A) imagens AFM de (a) superfície de grafite e (b) superfície com polipirrol e nanotubos de carbono	31
Figura 12 – Etapas da montagem do sensor	34
Figura 13 – A. eletrodo de referência; B. eletrodo de trabalho; C. contra eletrodo	34
Figura 14 – Célula eletroquímica contendo três eletrodos em uma solução de ferro-ferricianeto de potássio	35
Figura 15 – Análise eletroquímica das etapas de montagem do genossensor para leishmaniose. a) análise impedimétrica; b) análise voltamétrica	37
Figura 16 – Análise eletroquímica do genossensor frente às diferentes concentrações do genoma de <i>Leishmania</i> sp. a) impedância; b) voltametria	38
Figura 17 – Análise eletroquímica do sistema sensor frente à amostra de <i>S. mansoni</i>	39
Figura 18 – Análise eletroquímica do genossensor em relação a amostra de soro infectado. a) espectroscopia de impedância eletroquímica; b) voltametria cíclica	40
Figura 19 – Avaliação eletroquímica das etapas de montagem do genossensor. a) análise impedimétrica; b) análise voltamétrica	42
Figura 20 – Análise eletroquímica do genossensor frente às diferentes concentrações do genoma de <i>Schistosoma mansoni</i> . a) EIE. b) VC	44
Figura 21 – Resposta do genossensor frente amostra de DNA de <i>Leishmania</i> sp. a) análise impedimétrica; b) análise voltamétrica	46

- Figura 22** – Análise impedimétrica do genossensor em relação a amostra de pacientes infectados. a) amostra 11; b) amostra 18 **46**
- Figura 23** – Análise voltamétrica do genossensor em relação a amostras de pacientes infectados. a) amostra 11; b) amostra 18 **47**
- Figura 24** – Imagens da microscopia de força atômica para avaliação morfológica do genossensor **48**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultados obtidos através da equação de Randles...	44
Tabela 2 – Resultados dos cálculos do ΔR_{ct} baseado nas diferentes concentrações do genoma do <i>S. mansoni</i>	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFM	Microscopia de Força Atômica (do inglês atomic force microscopy)
Ag/AgCl	Prata/Cloreto de prata
AuNPs	Nanopartículas de ouro
BSA	Albumina de soro bovino (do inglês bovine serum albumin)
Cdl	Capacitância da dupla camada elétrica
CPE	Elemento de fase constante
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
EIE	Espectroscopia de impedância eletroquímica
Epa	Potencial de pico anódico
Epc	Potencial de pico catódico
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (em português ensaio de imunoabsorção enzimática)
HAuCl ₄	Ácido cloroáurico
HCl	Cloreto de hidrogênio
Ipa	Corrente de pico anódica
Ipc	Corrente de pico catódica
KCl	Cloreto de potássio
LCR	Líquido cefalorraquidiano
MBA	Ácido mercaptobenzóico
μL	Microlitros
μm	Micrometros
mHz	Megahertz
MPTS	3-mercaptopropiltrimetoxisilano
mV	Milivolts
NaCl	Cloreto de sódio
NE	Neuroesquistossomose
NHS	N-Hidroxisuccinimida
ng/mL	Nanogramas por mililitros
nm	Nanômetros
NSM	Neuroesquistossomose mansônica
OMS	Organização Mundial de Saúde

pg/mL	Picogramas por mililitros
Rct	Resistência de transferência de carga
Rs	Constante de resistência
Rsol	Resistência da solução
SNC	Sistema Nervoso Central
SPR	Ressonância plasmônica de superfície
VC	Voltametria cíclica
W	Difusão Warburg
ZW	Impedância de transporte de massa

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1	ESQUISTOSSOMOSE	14
2.1.1	Epidemiologia	15
2.1.2	Manifestações Clínicas	17
2.1.3	Diagnóstico	17
2.2	BIOSENSORES ELETROQUÍMICOS	18
2.2.1	Genossensores	19
2.3	CAMADAS AUTOMONTADA	21
2.3.1	MPTS	21
2.3.2	Nanopartículas de Ouro	21
2.4	TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO	22
2.4.1	Voltametria Cíclica	23
2.4.2	Espectroscopia de Impedância Eletroquímica	24
2.4.3	Microscopia de Força Atômica	26
3	OBJETIVOS	29
4	METODOLOGIA	30
4.1	Modificação do Eletrodo com MPTS, EDC/NHS e Nanopartículas De Ouro	30
4.2	Imobilização da Sonda de DNA de <i>Schistosoma Mansoni</i> sobre Eletrodo Modificado com AuNPs	30
4.3	Medidas de Impedância Eletroquímica e Simulação do Circuito Equivalente	31
4.4	Microscopia de Força Atômica	31
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1	Otimização da Plataforma Sensora com Material de <i>Leishmania</i> sp.	34
5.2	Análises Eletroquímicas da Superfície Sensora para <i>Schistosoma Mansoni</i>	36
5.3	Caracterização Morfológica	40

6	CONCLUSÃO	42
----------	------------------	-----------

REFERÊNCIAS**43**

1 Introdução

A Neuroesquistossomose mansônica (NSM), refere-se à infecção por *S. mansoni* com envolvimento do sistema nervoso central (SNC), que pode ou não resultar em manifestações clínicas. Quando sintomática, é um grave distúrbio no qual o prognóstico depende em grande parte do diagnóstico e tratamento precoces. Embora rara em comparação a alta prevalência de manifestações hepato-intestinais, a NSM não é pouco frequente e é provavelmente sub-reconhecida (Chen, 2006).

Os métodos diagnósticos da esquistossomose são divididos em duas categorias: métodos de detecção direta e métodos de detecção indireta. Os métodos para detectar o parasita, ovos, antígenos ou fragmentos são baseados em técnicas diretas. Os métodos indiretos usam marcadores bioquímicos, clínicos e imunológicos para identificar evidências indiretas da presença do parasita. Em adição, os métodos diretos e indiretos podem ser classificados em quantitativos e qualitativos. Os quantitativos detectam a presença do parasita e quantificam o número de ovos por grama de fezes, permitindo estimar a intensidade da carga parasitária. Os métodos qualitativos, por sua vez, identificam os tipos de parasitas e os classificam como positivos (presença de parasitas) ou negativos (ausência de parasitas) (Ferreira, 2016).

Na atualidade, o método utilizado como padrão ouro pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e pelo Ministério da Saúde para o diagnóstico da esquistossomose, é o Kato-Katz (Barbosa et al., 2017). Esta técnica se baseia na análise quantitativa de ovos do parasita em cada grama de fezes, tal método possui sensibilidade igual ou superior a outros métodos quantitativos (Teixeira, 2014).

Apesar de os ensaios de laboratório disponíveis, o diagnóstico da neuroesquistossomose, particularmente do distúrbio da medula espinhal, é em grande parte presuntivo, e com base na clínica. O diagnóstico preciso é obtido pelo estudo histopatológico através da biópsia (Santos et al., 2001). Outros exames subsidiários podem auxiliar na investigação diagnóstica, tais como o exame do líquido cefalorraquidiano.

Sendo assim, o emprego de metodologias diagnósticas alternativas que permite estabelecer índices de prevalência mais próximos da realidade, poderá contribuir muito para o controle desta doença (Buso et al., 2000).

Ultimamente, novas metodologias utilizando a determinação eletroquímica, têm atraído bastante atenção, pois os métodos eletroquímicos têm as vantagens de baixo custo, alta sensibilidade e ser de fácil manuseio (Xue et al., 2007). Nessa perspectiva, metodologias eletroquímicas impulsionaram a concepção de genossensores, os quais são dispositivos eletroanalíticos que incorporam uma camada genética imobilizada na superfície de um transdutor, como elemento de reconhecimento, convertendo informações de interação em sinais analíticos mensuráveis (Cheung, 2006). Desta forma, os genossensores eletroquímicos convertem sinais de interação entre bases nitrogenadas específicas, em sinais elétricos.

Atualmente, a utilização de camadas automontadas organossulfuradas tem se mostrado bastante eficaz devido a sua aplicabilidade no desenvolvimento de sensores eletroquímicos e seu alto grau de sensibilidade, disponibilidade de grupos químicos para imobilização orientada de biomoléculas, fornecimento de um microambiente compatível. A preparação das camadas automontadas possui um papel fundamental no desempenho eletroanalítico do eletrodo modificado (Freire, 2003).

Diante disso, neste estudo, a sonda de DNA será ligada covalentemente à superfície do eletrodo de ouro através das camadas automontadas de MPTS e EDC/NHS. Utilizando a espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE), que tem sido amplamente aplicada com propósito de complementar os estudos na bioeletroquímica, para desenvolvimento de biodispositivos, proporcionando um estudo da cinética do eletrodo e estudos da dupla camada elétrica (Wang et al., 2002). Este estudo oferece uma via fácil e eficaz para a imobilização da sonda de DNA sobre a superfície do eletrodo para aplicação na fabricação de genossensor eletroquímico para detecção do *Schistosoma mansoni*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ESQUISTOSSOMOSE

A Esquistossomose é causada pelo parasita *Schistosoma mansoni* e está diretamente relacionada ao saneamento precário (Brasil, 2021). A infecção esquistossomótica do sistema nervoso central é conhecida como neuroesquistossomose (NE). A disseminação e localização de ovos dentro do cérebro e da medula espinhal, bem como a resposta imune do hospedeiro, determinam as consequências da doença (Chen, 2006).

Quando as formas larvais do parasita – secretadas por caramujos de água doce – penetram na pele após o contato com a água infestada, as pessoas são infectadas e, quando pessoas com esquistossomose contaminam fontes de água doce, ocorre a transmissão. As larvas amadurecem em esquistossômulos adultos no corpo. Os vermes adultos vivem nas artérias sanguíneas, onde as fêmeas depositam seus ovos, alguns dos ovos são excretados nas fezes ou na urina, outros ficam alojados em tecidos internos, como fígado e baço, desencadeando respostas imunológicas e causando danos aos órgãos ao longo do tempo (WHO, 2022).

Esquistossomose

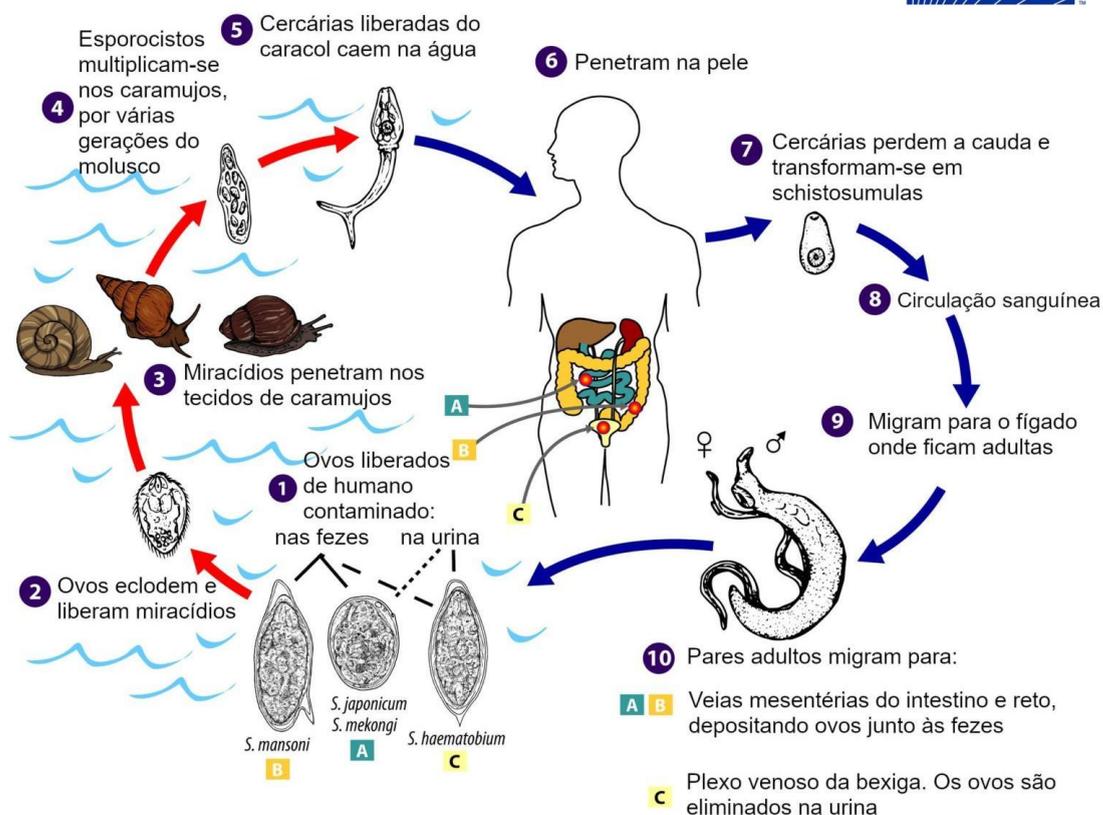


Figura 1. Ciclo evolutivo do *Schistosoma mansoni*. Fonte: Adaptado de Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2019.

1.1.1 Epidemiologia

A esquistossomose é uma doença endêmica que está ligada à pobreza e ao subdesenvolvimento (Rocha et al., 2016). Como a transmissão depende de caramujos como hospedeiros e ações humanas que resultam em contaminação e infecção da água, sua dispersão é focal. Os caramujos vetores pertencem ao gênero *Biomphalaria* spp. para *S. mansoni*, *Bulinus* spp. para *S. haematobium* e *S. intercalatum*, *Neotricula* spp. para *S. mekongi* e *Oncomelania* spp. para *S. japonicum*. No Brasil, essa parasitose é causada pelo *Schistosoma mansoni*, assim como na maioria dos países ao Sul do Saara, na Arábia peninsular, no Egito, na Líbia, em algumas ilhas do Caribe, no Suriname e na Venezuela (WHO, 2010).

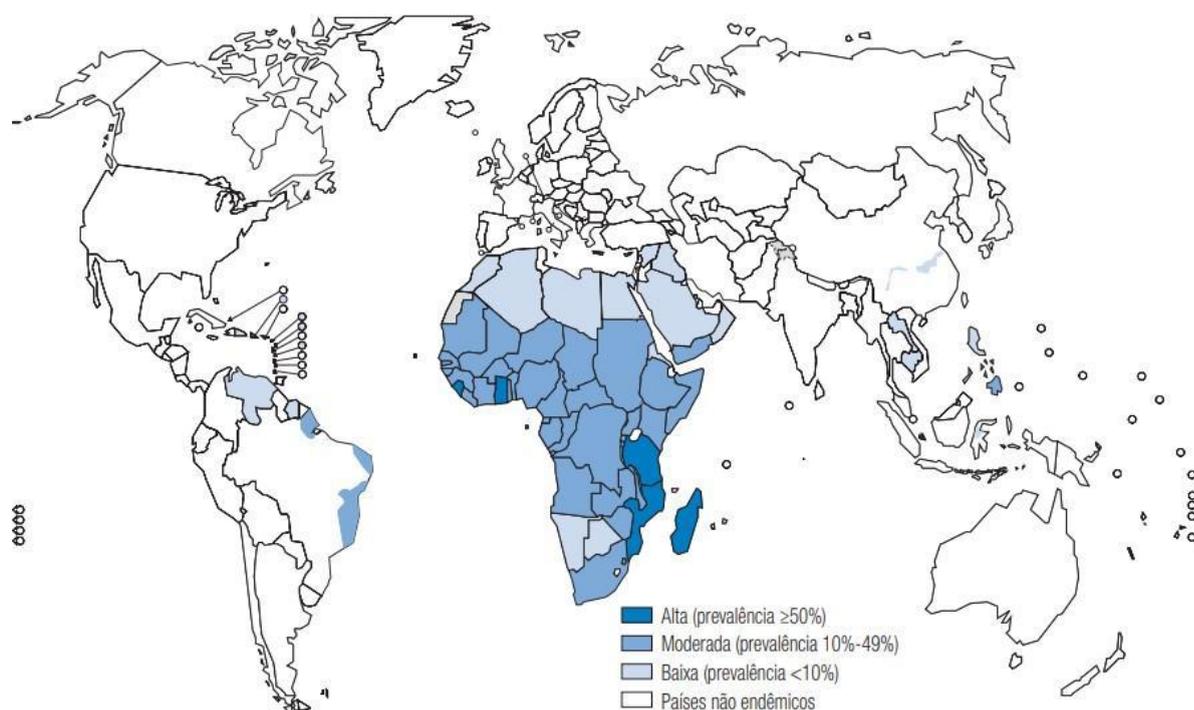


Figura 2. Distribuição da esquistossomose mundial. Fonte: WHO, 2009.

Atualmente, no Brasil, é estimado que cerca de 1,5 milhões de pessoas vivem em áreas que apresentam risco de contrair a doença, tendo como grande significância as regiões Nordeste e Sudeste, por apresentarem os moluscos transmissores (Brasil, 2021).

A esquistossomose está mais intensamente distribuída em uma faixa de terra contínua e contígua ao longo de quase toda a costa litorânea da região Nordeste, do Rio Grande do Norte ao Sul, incluindo as zonas quentes e úmidas dos estados da Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Bahia. Seguindo para o interior, chega a Minas Gerais no Sudeste, através das grandes bacias hidrográficas (Brasil, 2014).

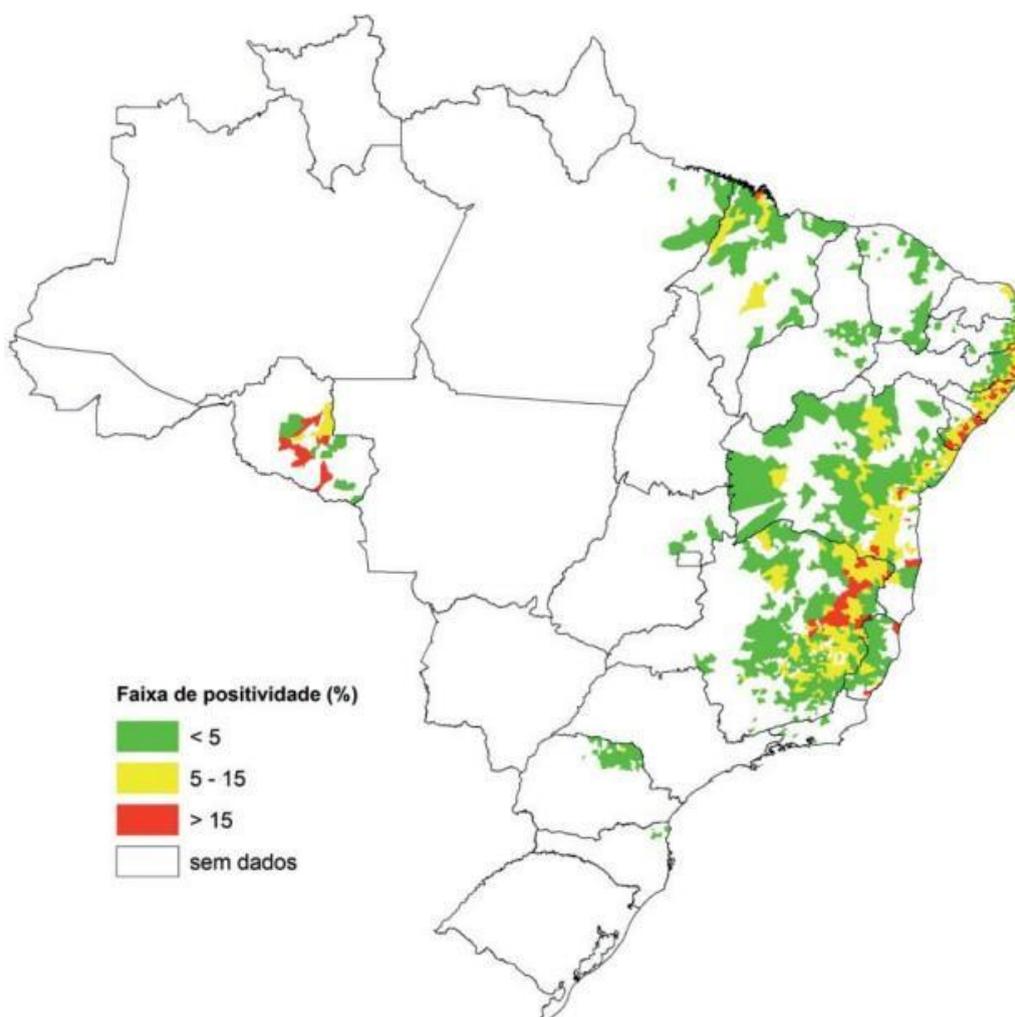


Figura 3. Distribuição da esquistossomose segundo percentual de positividade. Fonte: Brasil, 2015.

Dentre os Estados com maior incidência da esquistossomose, Pernambuco se destaca. No período de 2011 a 2019 ocorreram 1522 óbitos por esquistossomose, com uma média de 169 óbitos por ano. A maioria se deu na Região Metropolitana, com 743 óbitos, o que corresponde a 48,82%; seguido da Zona da Mata com 32,13% dos óbitos (489); no Sertão a representatividade foi bem baixa com apenas 0,85%. No ano de 2019 houve menos óbitos registrados, sendo 142, o que representa 9,33% dos óbitos (Silva et al, 2021).

Segundo estudo realizado por Gomes et al., na cidade de Porto de Galinhas, Pernambuco, apesar da quantidade de focos de transmissão da esquistossomose terem diminuído: de 15 para 11 entre 2000 e 2010, chegando a 9 em 2020, a taxa de infecção dos caramujos nesse mesmo período, após ir de 16,1% para 5,8% de 2000 para 2010, teve um aumento em 2020 chegando em 8,8%. Tal aumento está relacionado com o processo de urbanização na área descrita (Gomes et al., 2022).

2.1.2 Manifestações Clínicas

Os sintomas da esquistossomose são causados pela reação do corpo aos ovos dos vermes (WHO, 2022). Após a penetração das cercárias, inicia-se a fase aguda e a irritação no local pode surgir em poucas horas. O esquistossômulo em migração e maturação pode causar uma reação de hipersensibilidade sistêmica com febre, fraqueza geral, dor de cabeça, náuseas, vômitos, diarreia e tosse seca, uma a quatro semanas após a infecção (Silveira-Lemos et al., 2013).

Além disso, a infecção também pode evoluir para uma fase crônica, que pode se apresentar em diarreia com sangue, linfonomegalia e hepatoesplenomegalia. Ademais, pode ocorrer a fase pós-crônica, caracterizada por sequelas como hepatite, insuficiência renal, infertilidade, carcinoma urotelial e problemas neurológicos (Lima et al, 2019).

A neuroesquistossomose (NE) é o comprometimento do sistema nervoso causado diretamente pelo parasita ou indiretamente pela deposição de imunocomplexos circulantes, resultando ou não em sintomas e é a forma ectópica mais comum e incapacitante de infecção esquistossomótica (Moraes, Amaral, 2015).

Na neuroesquistossomose, a principal característica é a encefalopatia difusa que pode ser acompanhada por: febre, cefaleia, nistagmo, problemas de linguagem, vários graus de paresia e doenças dos nervos cranianos que são causados por compressão local por granulomas esquistossomóticos ou aumento da pressão intracraniana por edema ou obstrução da drenagem do líquido cefalorraquidiano (Oliveira Júnior, 2013).

2.1.3 Diagnóstico

O exame de fezes é fundamental no diagnóstico parasitológico, com particular importância para as técnicas de Lutz e Kato-Katz, este último é um método quantitativo que detecta a presença de ovos nas fezes após 45 dias de infecção, porém é um exame que apresenta baixa sensibilidade quando se há uma carga parasitária pequena (Vitorino et al, 2012). Já a técnica de Lutz, consiste na sedimentação espontânea de possíveis estruturas parasitárias em cálice de fundo cônico. Essa técnica é indicada para pesquisa de formas evolutivas com média e grande densidade, como ovos e larvas (Azevedo, 2016).

Os ensaios de detecção de anticorpos e antígenos, como o ELISA, são ferramentas promissoras que podem ser utilizadas além dos exames parasitológicos tradicionais. São ensaios auxiliares que podem monitorar respostas terapêuticas e persistência de infecções, mas não são utilizados em inquéritos populacionais porque requerem equipamentos laboratoriais especializados e a maior parte dos testes ainda está sendo validada (Siqueira et al, 2015). Os testes sorológicos nesta doença limitam-se a estudos epidemiológicos, mostrando apenas o contato prévio com o parasito e não a infecção realmente ativa.

No caso da esquistossomose medular, o diagnóstico é feito pela confirmação da presença de ovos de *S. mansoni* no tecido nervoso via biópsia ou necropsia. No entanto, o estudo histológico da medula espinhal implica em um procedimento invasivo com risco de consequências irreversíveis (Pimenta, Côrrea, Mesquita, 2010).

2.2 BIOCENSORES ELETROQUÍMICOS

O desenvolvimento de novos métodos diagnósticos se faz necessário para o diagnóstico da neuroesquistossomose, visto que, os procedimentos atuais tratam-se de recursos invasivos, como a biópsia (Santos et al., 2001). Nos dias de hoje, o desenvolvimento de novos sistemas para detecção de analitos bioquímicos, ambientais e industriais (a exemplo da indústria alimentícia) tem despertado o interesse de pesquisadores de diversas áreas, que continuam concentrando seus esforços no desenvolvimento de dispositivos sensíveis, seletivos, economicamente viáveis e de alto potencial de aplicação (Lima, 2020).

Como exemplo disso, têm-se os biossensores, que são dispositivos analíticos usados para quantificar e qualificar um determinado analito, onde um componente biológico e um detector físico-químico são combinados em sua estrutura (Amador Salomão, Emílio, 2018). No caso dos biossensores eletroquímicos, o componente físico-químico consiste em um elemento condutor, como o ouro, confeccionado em um eletrodo (Lima, 2020).

Além dos transdutores mecânicos e ópticos, como biossensores nanomecânicos ou biossensores baseados em ressonância plasmônica de superfície (SPR), os biossensores eletroquímicos têm sido amplamente utilizados na detecção de patologias (Cesewski, Johnson, 2020).

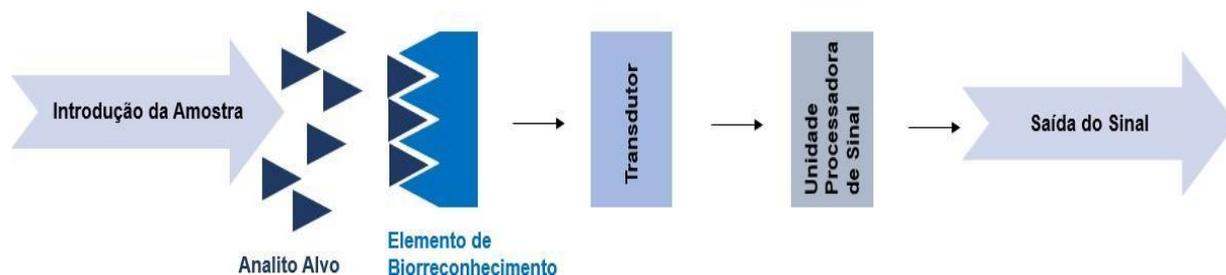


Figura 4. Esquema de funcionamento de biossensor para detecção do analito. Fonte: próprio autor.

2.2.1 Genossensores

Os genossensores são sensores de DNA que possuem como elemento de biorreconhecimento, segmentos nucleotídicos (Manzanares-Palenzuela et al., 2015).

Os biossensores eletroquímicos de DNA baseados na técnica de hibridização de ácidos nucleicos estão ganhando popularidade na biologia como meio de detectar e analisar sequências específicas de DNA, bem como detectar distúrbios patogênicos (Tiwari et al., 2015).

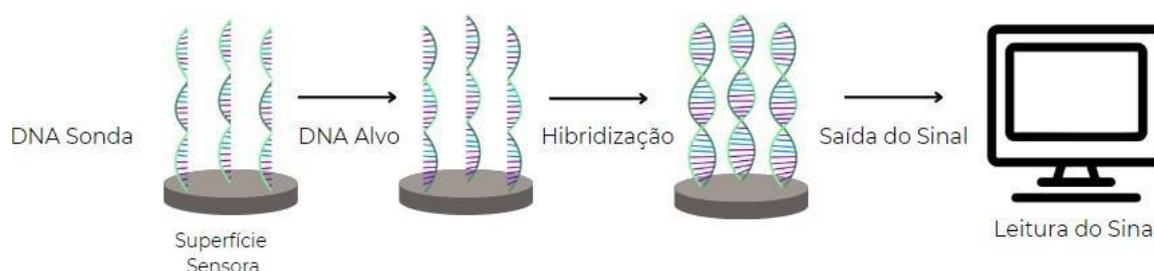


Figura 5. Representação esquemática de um genossensor. Fonte: próprio autor.

O biorreceptor em genossensores eletroquímicos pode ser uma sonda (sequência curta de oligonucleotídeos) ou um aptâmero (sequência de oligonucleotídeos sintéticos) imobilizado na superfície do transdutor. Essas sequências oligonucleotídicas reconhecem o analito (ácidos nucleicos) por complementaridade, formando duplex, devido à sua afinidade (El Goumi, 2017).

Na literatura, já foram relatadas a adsorção física, o aprisionamento em um gel ou polímero, a ligação covalente, a reticulação e a polimerização eletroquímica como formas de imobilizar sondas de DNA em superfícies de eletrodos (Zhang, 2008).

Com o avanço dos nanomateriais abre novas possibilidades para o desenvolvimento de sensores eletroquímicos de DNA que podem aumentar as taxas de imobilização e transferência de elétrons, mantendo alta seletividade (Niu et al., 2017). Os nanomateriais funcionais utilizados atualmente para projetar genossensores são as nanopartículas metálicas, os quantum dots, nanomateriais baseados em carbono, nanopartículas magnéticas e polímeros (Zhu et al., 2015)

Em 2015, foi desenvolvida por Garcia, uma plataforma nanoestruturada para detecção da leishmaniose. Foi utilizado uma combinação de nanocompósito de ouro e polianilina para modificação da superfície de trabalho e posterior adição de nanopartículas de ouro, obtendo com sucesso um sensor capaz de diagnosticar, através da hibridização do DNA, a leishmaniose (Garcia, 2015).

Santos et al., em 2019, desenvolveu um genossensor para esquistossomose, através da eletrodeposição de nanopartículas de ouro (AuNPs). O sensor foi exposto à uma solução de MPTS (3-mercaptopropiltrimetoxisilano) e, em seguida, AuNPs foram eletroquimicamente sintetizadas. Após isto, uma sonda específica para *S. mansoni* foi adicionada à plataforma. A partir disto, o biossensor foi capaz de reconhecer o DNA do *Schistosoma mansoni*, por meio de hibridização, em diferentes tipos de amostras, como LCR, urina e soro (Santos et al., 2019).

Heli e colaboradores utilizaram pontos quânticos de ferrita magnética de cobalto-zinco ($\text{Co}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$) para modificar um eletrodo de pasta de carbono para diagnóstico da leishmaniose. Eles relatam que os pontos quânticos têm uma grande área de superfície devido ao seu pequeno tamanho, permitindo a captura de uma grande quantidade de DNA. Com isso, ofereciam uma alta concentração de superfície na sonda e, a ferrita de cobalto demonstrou interagir firme e diretamente com o DNA, estabilizando sua estrutura. Após a construção da plataforma nanoestruturada, eles foram capazes de avaliar amostras de pacientes infectados com *Leishmania* (Heli et al., 2016).

2.3 CAMADAS AUTOMONTADAS

As camadas automontadas são descritas como filmes de espessura monomolecular que são constituídos por moléculas orgânicas organizadas espontaneamente sobre uma superfície, geralmente sólida (Benites et al., 2014). Para a formação destas camadas, é necessária a quimissorção em uma superfície

seguida da organização espontânea de domínios moleculares de longo alcance cristalinos em 2D. Geralmente, as moléculas capazes de formarem as camadas automontadas, são compostas de três partes: a extremidade da molécula que se liga à superfície (grupo principal), uma espinha dorsal composta por uma cadeia alifática e/ou um oligômero aromático (ordenação molecular), e o grupo terminal, que determina a topografia, a energia de superfície e a química da interface externa (Casalini et al., 2017).

As configurações espaciais da monocamada automontada de sondas de DNA na superfície do eletrodo são bem conhecidas por terem um impacto significativo no desempenho do sensor (Li, 2018).

Modificações na superfície com camadas automontadas permitem a construção de dispositivos biossensores orgânicos, proteção de superfícies metálicas contra corrosão e o controle das propriedades físico-químicas de superfícies (Benites et al., 2014). Por isso, é de grande interesse a avaliação destas camadas.

2.3.1 MPTS (3-mercaptopropiltrimetoxisilano)

Ao empregar monocamadas automontadas, o MPTS é um agente de revestimento amplamente utilizado para alterar bioquimicamente as superfícies eletródicas, ao mesmo tempo em que aumenta a sensibilidade e a estabilidade, devido à sua afinidade pelo ouro. (Soysaldi, Soyulu, 2021). Trata-se de um agente de acoplamento para materiais, à base de Silício (Wu et al, 2015).

O MPTS é conhecido por gerar uma estrutura 3D com vários grupos tiol, por processos de hidrólise e condensação, que possuem uma grande atração pelo ouro. O MPTS é capaz de passar por quimisorção em superfícies de ouro, bem como simplesmente ligar nanopartículas de ouro graças aos grupos de tióis espalhados por toda a molécula (Parra-Alfambra et al., 2011).

2.3.2 Nanopartículas de Ouro (AuNPs)

Devido às suas qualidades únicas, como preservar a atividade biológica, garantir interfaces de condução eficientes com transdução de sinal eletroquímico e capacidade de ampliar a resposta elétrica, as nanopartículas de ouro têm sido engenhosamente empregadas para imobilizar a sonda de DNA tiolado na superfície

do eletrodo (Das et al, 2014).

Por conta de suas características incomparáveis, como sua capacidade de conjugar eficientemente com uma variedade de biomoléculas e sua vasta área de superfície, as AuNPs se tornam um excelente transdutor para os biossensores (Ilbeigi, 2021).

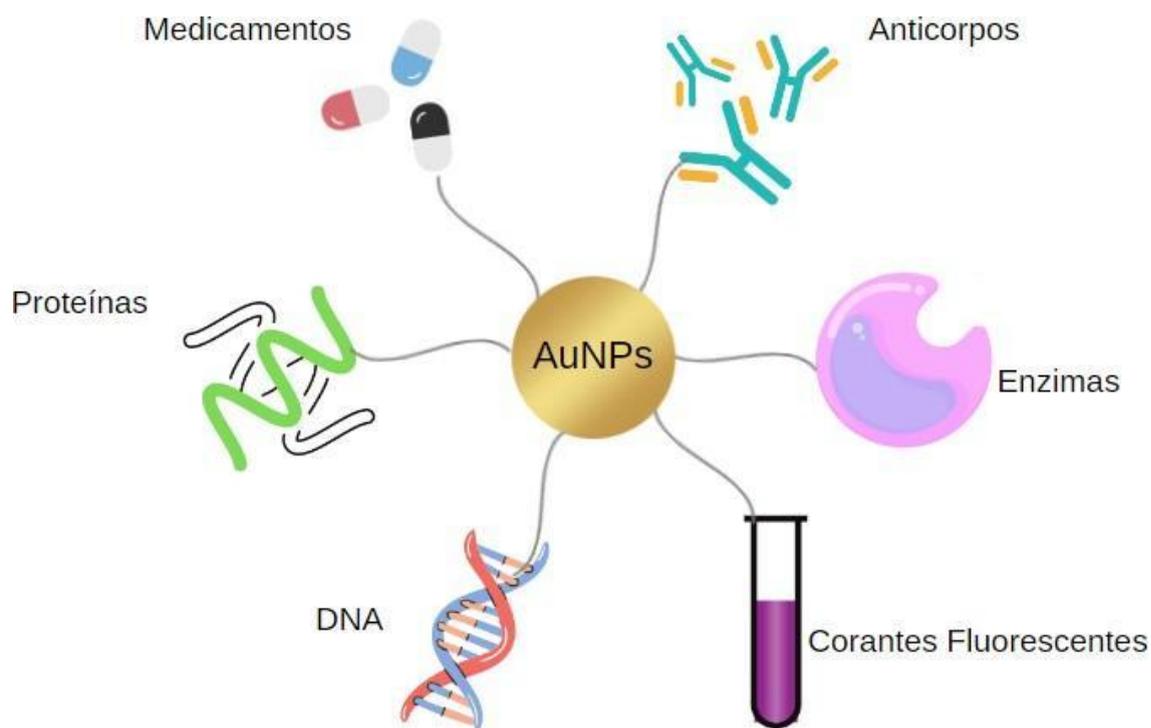


Figura 6. Moléculas passíveis de se ligar à nanopartículas de ouro. Fonte: próprio autor.

Os conjugados de nanopartículas de DNA-ouro, devido às suas propriedades químicas e físicas únicas e simplicidade de produção, têm sido investigados como um dos nanomateriais mais atraentes (Kaur et al, 2018). Além disso, o tamanho e as características das nanopartículas as tornam plataformas ideais para detectar e identificar doenças em amostras biológicas naturais (Mobed et al., 2020).

2.4 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO

As abordagens eletroanalíticas dependem de características elétricas quantificáveis (corrente elétrica, diferenças de potencial, acúmulo de carga interfacial e assim por diante) decorrentes de eventos em que uma espécie redox interage física e/ou quimicamente com outros componentes do meio, ou mesmo com as superfícies. Essas interações ocorrem quando há alguma perturbação controlada do

sistema, como, uma diferença de potencial entre eletrodos numa célula eletroquímica (Pacheco et al, 2013).

Normalmente, as células eletroquímicas são formadas por três eletrodos, o de referência, que serve para manter o potencial constante, o de trabalho, onde será construído o sistema sensor, e o contra eletrodo, utilizado para auxiliar na estabilidade. Tais reações, irão acontecer em uma solução contendo o eletrólito, o ferro-ferricianeto de potássio (Santos, 2019). Através de uma célula eletroquímica acoplada a um potenciostato, dispositivo eletrônico que pode aplicar uma diferença de potencial enquanto monitora simultaneamente o fluxo de corrente elétrica entre os eletrodos, permitindo que ocorram reações redox (Silva et al., 2020). Quando comparadas às técnicas existentes utilizadas na construção de biossensores, as técnicas eletroanalíticas, como a voltametria cíclica e a espectroscopia de impedância eletroquímica, se destacam por apresentarem inúmeras vantagens como seletividade, especificidade, reprodutibilidade, precisão, excelente tempo de resposta e estabilidade química, permitindo sua aplicação em diversas áreas (Santos, 2019).

2.4.1 Voltametria Cíclica (VC)

A voltametria é uma técnica eletroanalítica baseada em fenômenos que ocorrem na interface entre a superfície do eletrodo de trabalho e uma fina camada de solução próxima a ela. A célula eletroquímica é classificada como dinâmica porque opera na presença de uma corrente elétrica ($I > 0$), que é medida em função da aplicação controlada de uma tensão. Assim, quando uma diferença de potencial é introduzida entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência, a informação sobre o analito é recuperada pela medição da magnitude da corrente elétrica que ocorre entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo auxiliar (Pacheco et al., 2013).

Na voltametria, inicia-se a aplicação do potencial de um valor no qual nenhuma redução ocorre, com o aumento do potencial para regiões mais negativas (catódica) ocorre a redução do composto em solução, gerando um pico de corrente proporcional à concentração deste composto, quando o potencial já tiver atingido um valor no qual nenhuma reação de redução ocorre, o potencial é varrido no sentido inverso, até o valor inicial, e no caso de uma reação reversível, os produtos que tiverem sido gerados no sentido direto (e se localizam ainda próximos à superfície do eletrodo) serão oxidados, gerando um pico simétrico ao pico da redução. O tipo

de voltamograma gerado depende do tipo de mecanismo redox que o composto em questão sofre no eletrodo, o que faz da voltametria cíclica uma ferramenta valiosa para estudos mecanísticos (Garcia, 2015).

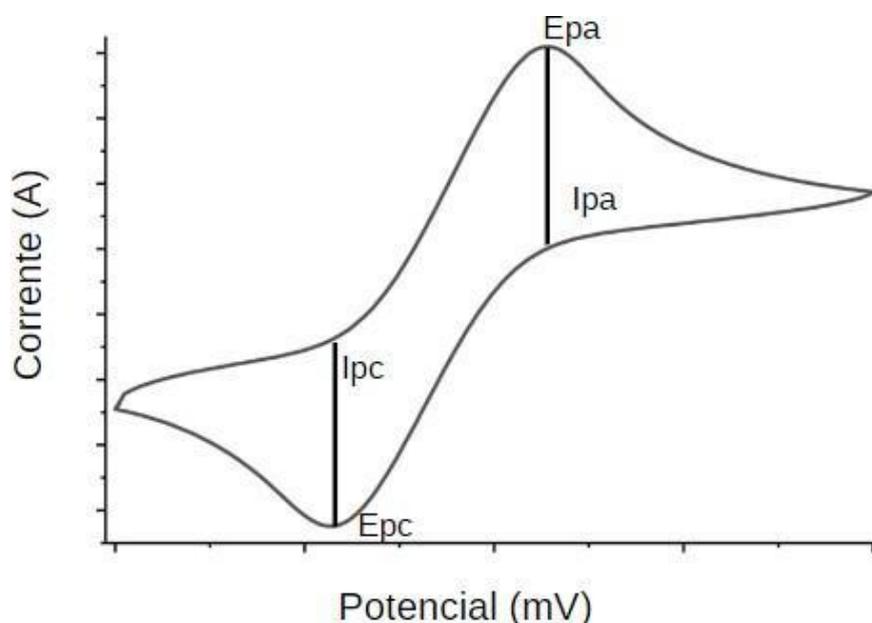


Figura 7. Representação de um voltamograma cíclico, em que I_{pa} : corrente de pico anódica, I_{pc} : corrente de pico catódica, E_{pa} : potencial de pico anódico e E_{pc} : potencial de pico catódico. Fonte: próprio autor.

Esse método tem a vantagem de poder medir diretamente na amostra sem a necessidade de procedimentos de pré-purificação ou separações prévias, além de permitir a análise de materiais coloridos ou amostras contendo partículas sólidas dispersas (Souza, 2003).

2.4.2 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE)

Por avaliar a relação entre a corrente e a diferença de potencial aplicada no domínio da frequência, a espectroscopia de impedância eletroquímica é única entre as técnicas eletroquímicas padrão. A abordagem da EIE, em particular, é calcular a função de transferência entre corrente e potencial (Ciucci, 2018).

O princípio elétrico fundamental da EIE é de que uma interface pode ser vista como elementos de resistência elétrica, tais como capacitância e indutância. Quando estes elementos são submetidos a uma corrente alternada, aplica-se a lei de Ohm (Ribeiro, 2015). Na lei Ôhmica, o potencial (U) sobre um condutor metálico, é proporcional, em temperatura constante, ao fluxo elétrico de corrente através do

condutor (I), sendo assim:

$$R = U/I$$

Os componentes de impedância real e imaginário são exibidos um contra o outro em gráficos de Nyquist, que possibilitam o cálculo da resistências de solução, resistências de transferência de carga e impedância de Warburg, bem como constantes de tempo (Randviir, 2013).

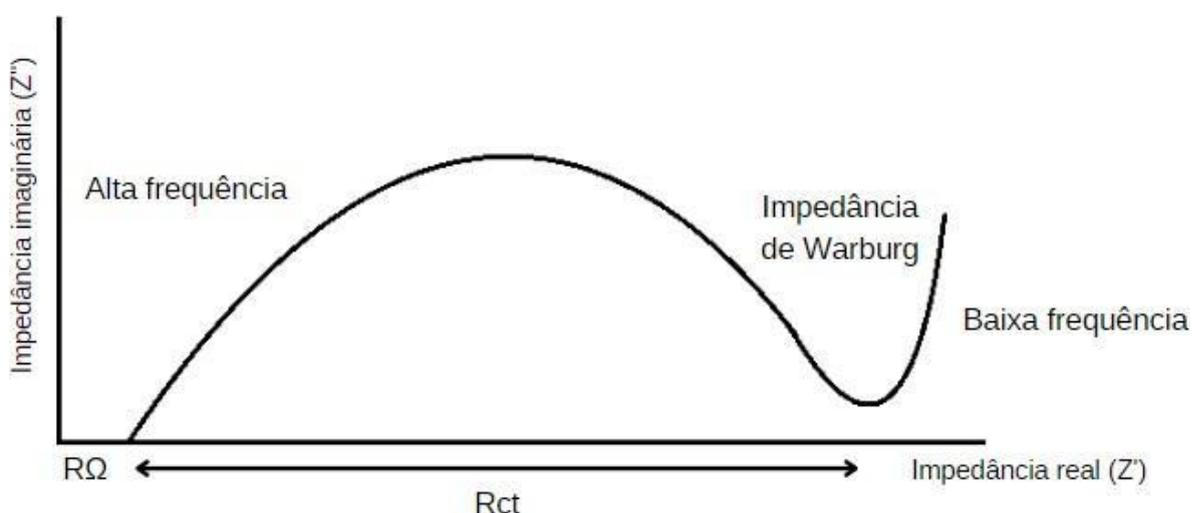


Figura 8. Representação do diagrama de Nyquist. Fonte: próprio autor.

O modelo de Randles é amplamente utilizado como um modelo agregado representativo do comportamento elétrico da célula eletroquímica. Neste circuito simplificado, os parâmetros concentrados R_{ct} , C_{dl} e z_W representam a resistência de transferência de carga da placa, a capacitância eletroquímica de dupla camada, e o Warburg, a impedância de transporte de massa, respectivamente, que estão presentes entre os eletrodos no eletrólito e, tendo R_s como uma constante, demonstrado na figura 9 (Stevanatto, 2014).

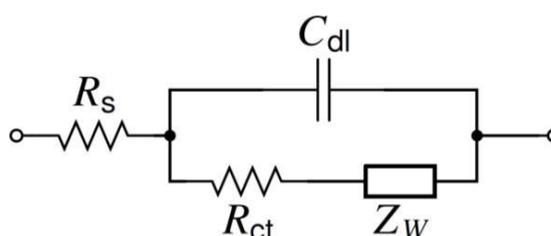


Figura 9. Circuito equivalente de Randles.

A técnica de EIE tem sido amplamente utilizada no campo de biossensores

livres de marcadores que são sensíveis à hibridização de oligonucleotídeos de DNA como um dispositivo de detecção não destrutivo e razoavelmente simples de usar (Shariati, 2018).

2.4.3 Microscopia de Força Atômica (AFM)

A rugosidade da superfície é medida usando microscopia de força atômica (AFM), uma técnica topográfica tridimensional com alta resolução atômica (Vahabi, 2013). O AFM foi projetado para aplicações biológicas em ambientes naturais, com capacidade de monitorar a flexão da sonda cantilever com precisão excepcional. Isto permite que o AFM seja utilizado como um nanosensor mecânico ou um transdutor micromecânico no desenvolvimento de biossensores (Pesi et al., 2016). A deflexão do cantilever é medida usando um laser refletido na parte traseira do cantilever e refletido em um fotodetector sensível à posição (Alexander Reese; Xu, 2018).

O conceito de trabalho da microscopia de força atômica é baseado na interação que ocorre entre os átomos que compõem sua ponta e os átomos que compõem a superfície da amostra à medida que a varredura avança (Pinto, 2013).

Na pesquisa de amostras de materiais e ciências da vida, bem como em muitas aplicações industriais, o AFM é frequentemente utilizado para gerar imagens topográficas de uma variedade de substâncias (Dazzi; Prater, 2016).

A ponta do cantilever varre a superfície da amostra em um AFM enquanto a força entre a ponta e a amostra permanece constante. A deflexão da ponta é medida visualmente refletindo um feixe de laser no topo do cantilever. Um fotodiodo é usado para medir pequenas mudanças no caminho da luz, como visto na figura 10 (Pasha; Sadeghi, 2020).

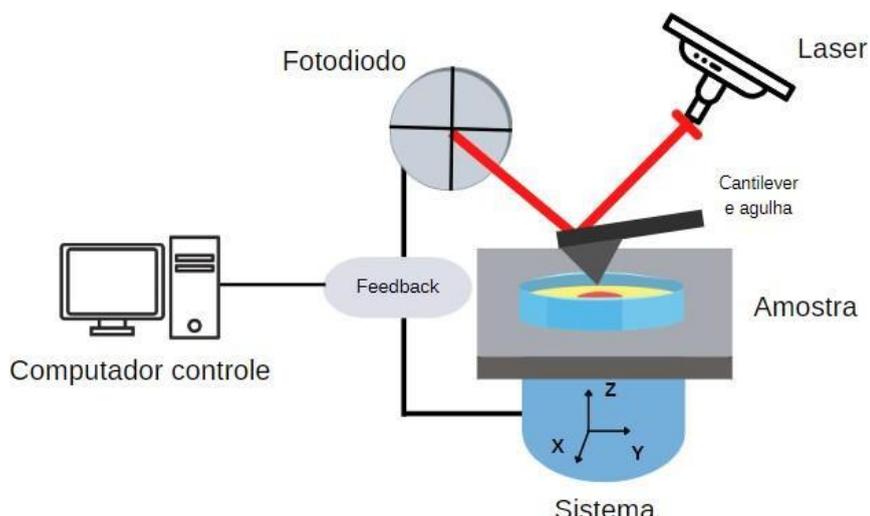


Figura 10. Esquema de funcionamento do AFM. Fonte: próprio autor.

Quando comparado a outros microscópios, o AFM tem as seguintes vantagens: maior resolução, imagens tridimensionais, não há necessidade de cobrir a amostra com material condutor, não há necessidade de métodos especiais de preparação de amostras, quantificação direta da rugosidade da amostra, medição de filmes ultrafinos em substratos e análise fractal, além disso, também é possível fazer imagens da superfície imersa em líquidos (Pinto, 2013).

O AFM foi recentemente utilizado para resolver a estrutura morfológica da superfície de moléculas de ácido nucleico em nanoescala e para entender melhor a natureza dos contatos de superfície de eletrodos de DNA (Diculesco, 2016).

Cheraghi utilizou da microscopia de força atômica para investigar a caracterização do eletrodo de grafite antes e depois da modificação da superfície com polipirrol e nanotubos de carbono. Na plataforma em questão, ao realizar o AFM da plataforma não modificada, a imagem aparece plana e, ao adicionar o polipirrol e os nanotubos de carbono, a plataforma apresenta uma profundidade. Com isso, obtiveram um sensor para análise de ciprofloxacina como agente quimioterápico (Cheraghi, 2017).

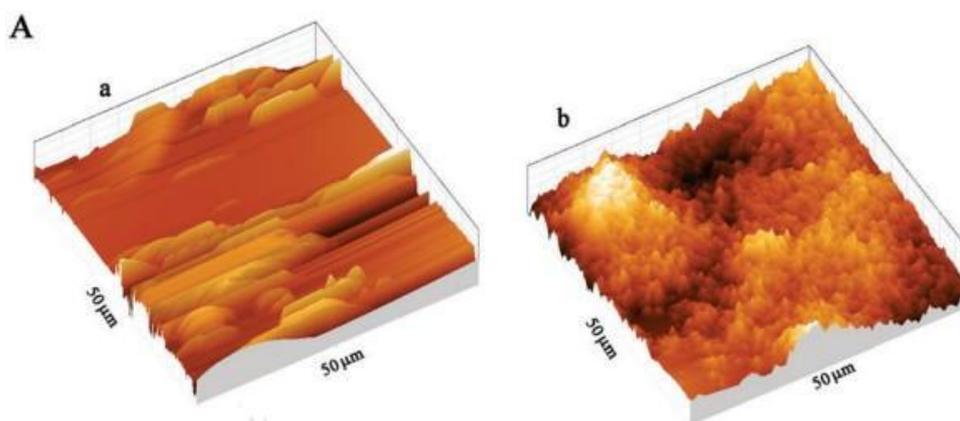


Figura 11. (A) imagens AFM de (a) superfície de grafite e (b) superfície com polipirrol e nanotubos de carbono. Fonte: Cheraghi, 2017.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um biodispositivo impedimétrico para o diagnóstico da Esquistossomose mansônica.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a resposta eletroquímica do processo de automontagem da camada de 3-mercaptopropil-trimetoxisilano (MPTS) e nanopartículas de ouro;
- Otimização da plataforma utilizando material de *Leishmania* sp.
- Determinar os parâmetros físico-químicos da sonda de *Schistosoma mansoni*, a qual será utilizada como elemento de biodetecção;
- Utilizar a técnica de EIE e VC para caracterização da interação Sonda-Genoma do *S. mansoni* em pacientes com neuroesquistossomose;
- Determinar a capacitância da dupla camada elétrica (Cdl) e da resistência à transferência de carga (Zre);
- Análise das modificações da superfície através da Microscopia de Força Atômica.

4 METODOLOGIA

A sonda e o genoma de *Schistosoma mansoni* foram cedidos pelo Dr. Fábio Lopes de Melo, obtidas no Laboratório de Doenças Transmissíveis – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães. As amostras de pacientes também serão cedidas pelo Laboratório de Doenças Transmissíveis, o qual possui as atividades de seu laboratório devidamente autorizadas pelo comitê de ética da UFPE.

4.1 MODIFICAÇÃO DO ELETRODO COM MPTS, EDC/NHS E NANOPARTÍCULAS DE OURO

Inicialmente, o eletrodo foi polido com lixa e água deionizada e colocado imerso em água sanitária por 10 minutos. Em seguida, na solução de MPTS, que foi preparada através da mistura com água destilada na proporção de 0,5 µL de MPTS para 100 µL de água destilada e 600 µL de HCl 0,1M, onde foi agitada até obter uma solução homogênea, foi adicionado 3 µL na superfície do eletrodo e incubado por 2 minutos.

A nanopartícula foi sintetizada a partir da diluição de 1 mL de HAuCl_4 em 99 mL de água, seguida da adição de 4 mL de 1% de citrato de sódio e agitação magnética em 60°C por 30 minutos. A AuNPs foi então diluída em água e depois, adicionado 0.2 mL de 10^{-3} M de MBA, sendo mantido por 2 horas na agitação magnética à temperatura ambiente (Luna et al., 2015). Após a adição de 1 µL de EDC e 1 µL de NHS e incubação por 5 minutos, foi adicionado 5 µL de AuNPs, mantendo o eletrodo incubado durante 30 minutos.

4.2 IMOBILIZAÇÃO DA SONDA DE DNA DE SCHISTOSOMA MANSONI SOBRE ELETRODO MODIFICADO COM AuNPs

Após a adição das nanopartículas de ouro, 2 µL de sonda de DNA_{Schistosoma} foram adicionados ao eletrodo e incubados por 30 minutos. Em seguida, o eletrodo modificado com DNA foi enxaguado com água destilada para remover o sDNA_{Schistosoma} fracamente adsorvido. Posteriormente, os sítios ativos remanescentes foram bloqueados com BSA (10 µg/mL). O eletrodo obtido, MPTS/EDC:NHS/AuNPs, foi, então, exposto ao material genômico extraído do soro de pacientes com neuroesquistossomose.

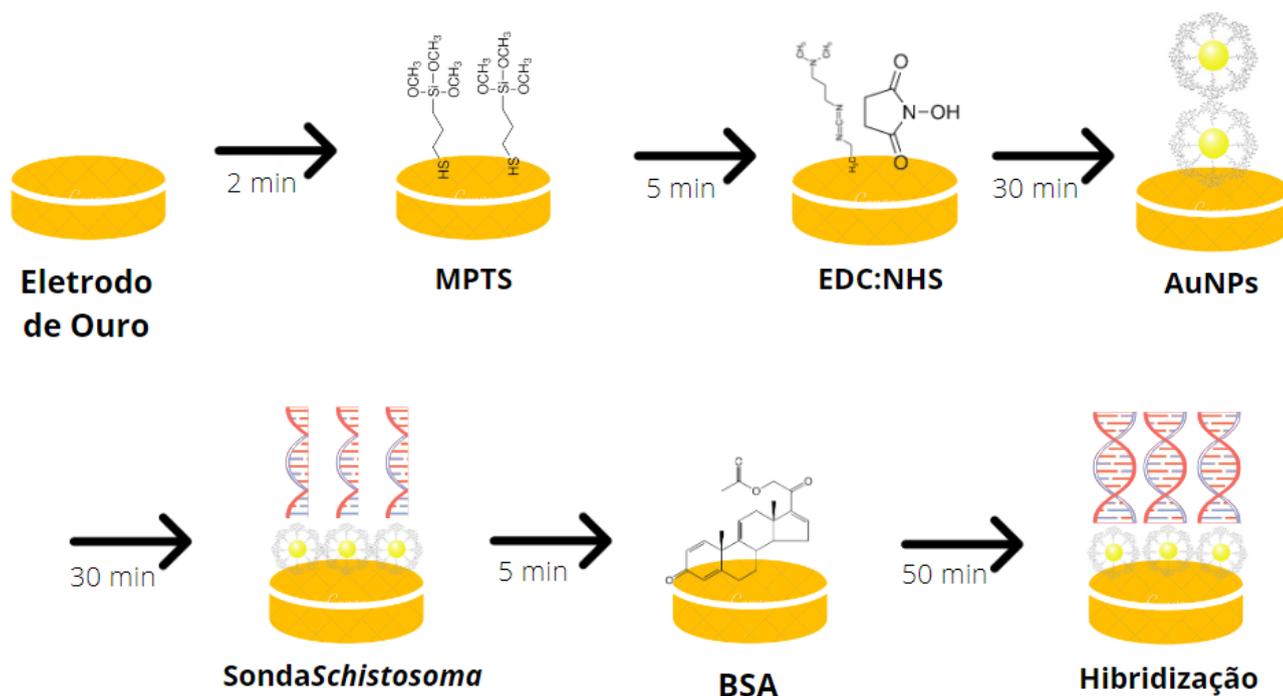


Figura 12. Etapas da montagem do sensor. Fonte: próprio autor.

4.3 MEDIDAS DE IMPEDÂNCIA ELETROQUÍMICA E SIMULAÇÃO DO CIRCUITO EQUIVALENTE

Os experimentos de EIE foram realizados em um potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT 128N (Autolab, Eco Chemie, Holanda) numa célula convencional de três eletrodos. Os eletrodos de trabalho utilizados foram um de platina e um de ouro modificados com a sonda, o eletrodo de platina como contra eletrodo e o de referência foi o Ag/AgCl saturado com KCl.

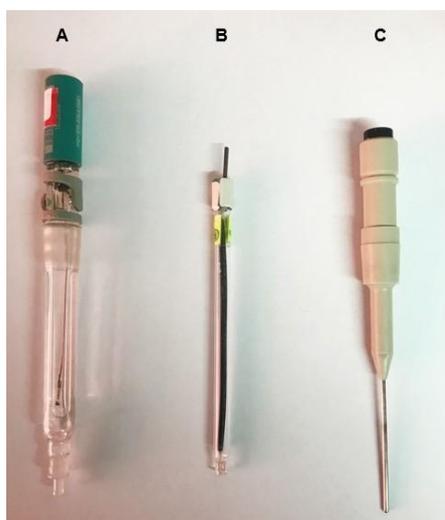


Figura 13. A. eletrodo de referência; B. eletrodo de trabalho; C. contra eletrodo. Fonte: próprio autor.

As medidas de impedância eletroquímica da espectroscopia foram realizadas

na mesma solução de 10 mM de ferro-ferricianeto de potássio [K₄(Fe(CN)₆)/K₃(Fe(CN)₆)] (1:1) em NaCl numa faixa de frequência entre 100 mHz a 100 KHz com um potencial de amplitude alternada de 10 mV. Já a voltametria, foi medida com faixa de frequência de 0,2 a 0,7 V e amplitude 50 mV.s⁻¹ (Oliveira et al., 2008).



Figura 14. Célula eletroquímica contendo três eletrodos em uma solução de ferro-ferricianeto de potássio. Fonte: próprio autor.

4.4 SIMULAÇÃO DO CIRCUITO EQUIVALENTE

Os gráficos de impedância eletroquímica (diagramas de Nyquist) foram submetidos à análise de dados através do programa NOVA, a partir do qual foram obtidas curvas teóricas referentes a cada sistema, com o objetivo de explorar o comportamento interfacial do sistema MPTS/EDC:NHS/AuNPs-Sonda_{Schistosoma} e MPTS/EDC:NHS/AuNPs-Sonda_{Schistosoma} frente ao analito de interesse.

4.5 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA

As modificações nas superfícies do eletrodo foram realizadas utilizando um microscópio de força atômica SPM-9700 (Shimadzu, Japão) com ponta de prova (“cantilever”) ajustado para o modo não-contato.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OTIMIZAÇÃO DA PLATAFORMA SENSORA COM MATERIAL DE *LEISHMANIA*

Na avaliação do eletrodo limpo, o diagrama de Nyquist se mostrou limitado por difusão e, ao adicionar a camada de MPTS, houve um aumento do semicírculo, comprovando que se obteve resposta na ligação. Após a adição do sistema ligante EDC:NHS, houve uma diminuição do semicírculo, caracterizado pelo aumento da condutividade do sistema. O grupamento tiol do MPTS que é exposto, é importante para a posterior adsorção da nanopartícula de ouro que, ao ser adicionada, provoca um aumento do semicírculo. Esta resposta indica que a ancoragem de AuNPs sobre o MPTS foi efetiva, aumentando a superfície eletroativa do eletrodo (Huayu et al., 2013).

Continuando a montagem da plataforma, a adição da sDNA_{Leishmania} provocou um outro aumento no diâmetro do semicírculo no gráfico em decorrência à repulsão eletrostática entre o par redox e a sonda de DNA na superfície do eletrodo. Em seguida, os sítios restantes foram preenchidos através da BSA, sendo evidenciado um discreto aumento do semicírculo. Foi formada, então, a plataforma sensora MPTS_EDC:NHS_AuNPs_BSA para detecção da Leishmaniose.

Em relação à avaliação voltamétrica, se observa uma redução da corrente de pico anódica após a adição do MPTS, quando comparado ao eletrodo limpo. Podendo assim dizer, que se obteve uma montagem efetiva da camada MPTS na superfície do eletrodo. Em seguida, há um aumento após a adição do EDC:NHS e, após isto, foi verificado uma diminuição das correntes de pico anódica e catódica devido à adição de AuNPs, o que resulta em aumento da área superficial. Ao ser adicionado a Sonda de DNA, é possível observar outra diminuição do pico e, por último, mais uma diminuição das correntes quando o BSA foi adicionado para bloquear os sítios restantes. Tais etapas podem ser observadas na figura 15.

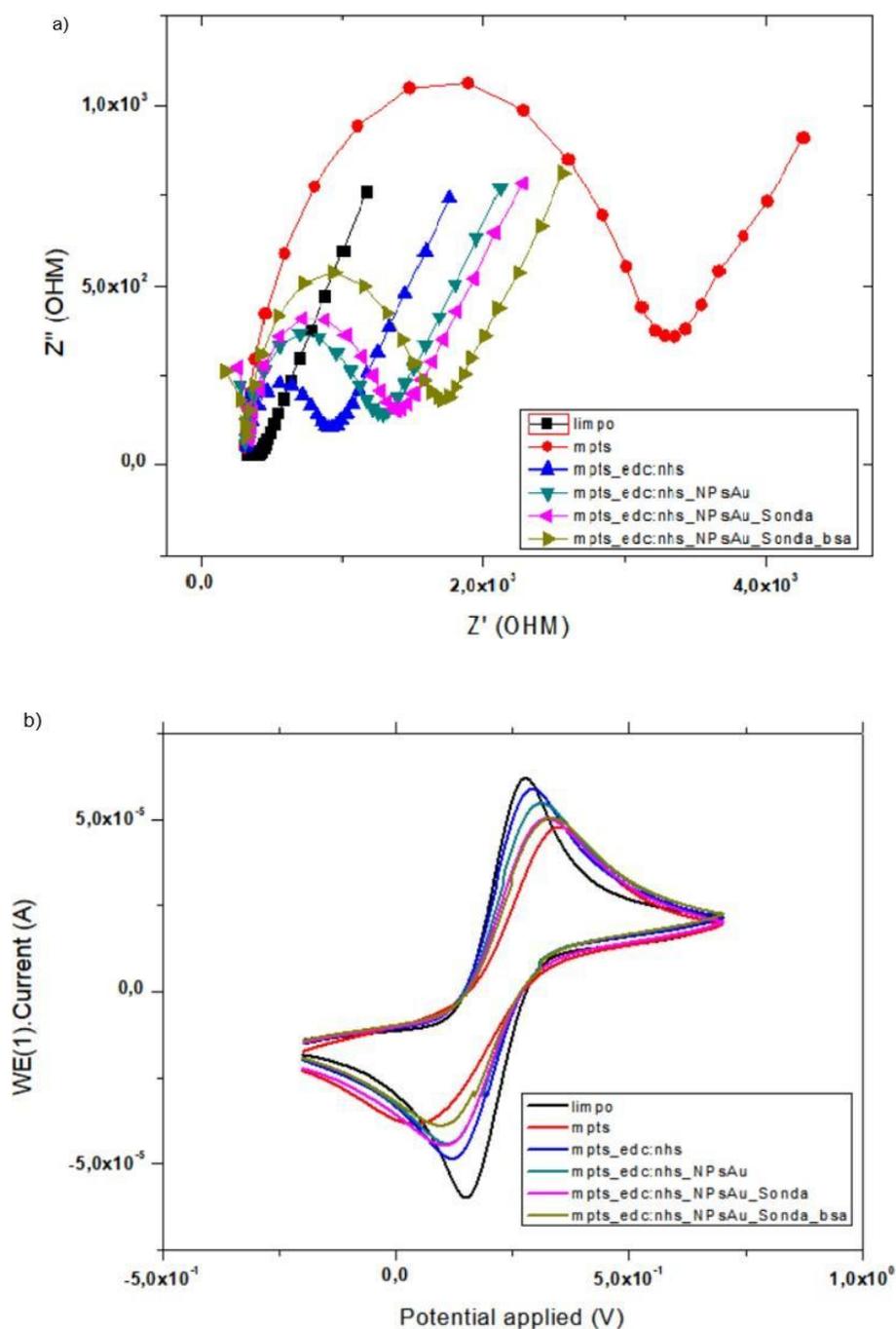


Figura 15. Análise eletroquímica das etapas de montagem do genossensor para leishmaniose. a) análise impedimétrica; b) análise voltamétrica. Fonte: próprio autor.

A avaliação da bioatividade do sistema sensor permitiu evidenciar a capacidade de reconhecimento específico às sequências complementares da amostra-teste, demonstrado na figura 16. Desta forma, foi avaliada a bioatividade da plataforma, adicionando DNA complementar, sendo observado um aumento gradativo da impedância e total do sistema e uma diminuição dos picos anódicos em diferentes concentrações do analito avaliado, indicando a ocorrência de hibridização e reconhecimento. O sistema foi capaz de responder às diferentes concentrações do

genoma da *Leishmania* sp., sendo capaz de responder ao analito de $0,0001 \text{ ng/mL}^{-1}$ em até 1 ng/mL^{-1} .

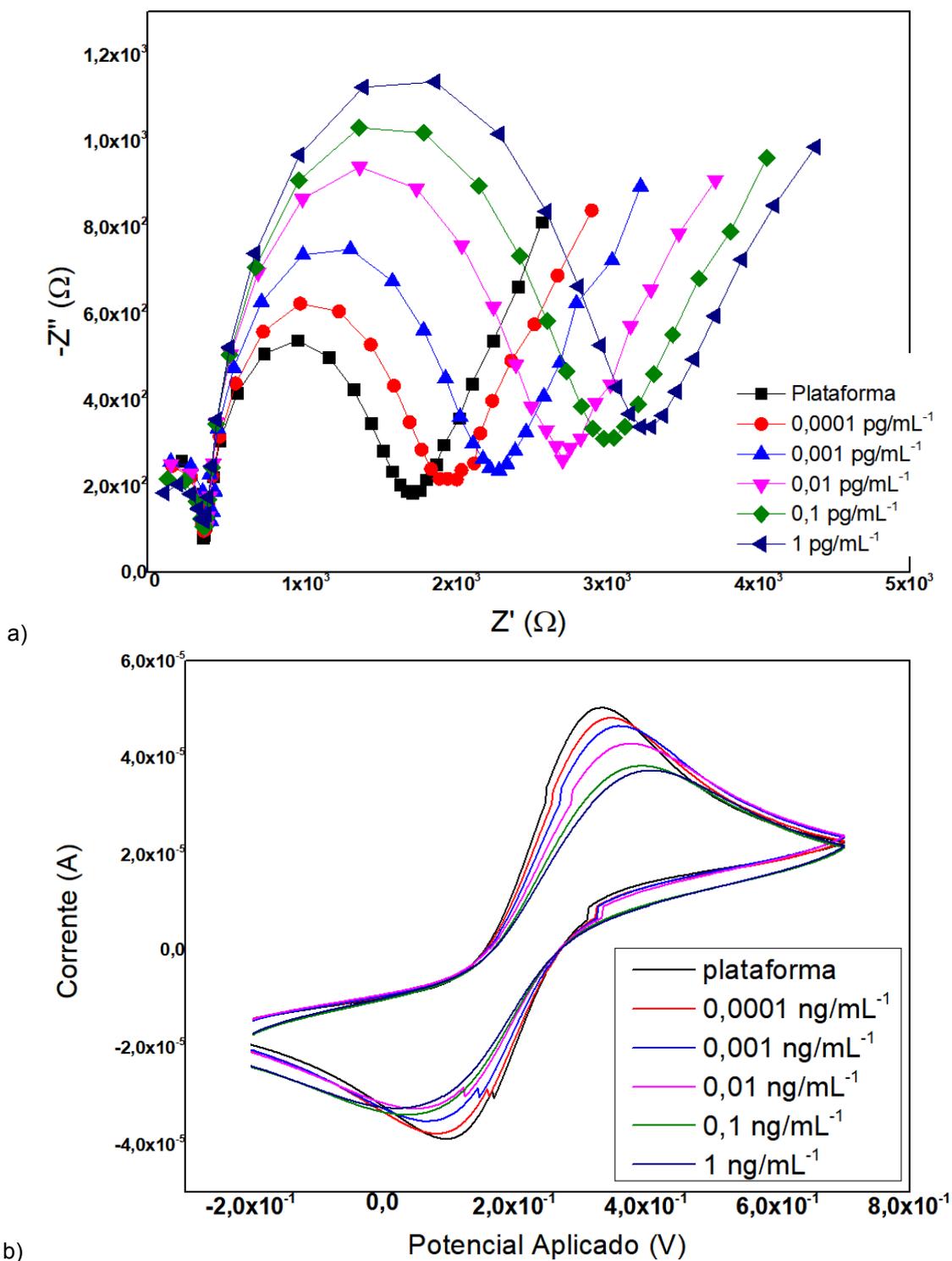


Figura 16. Análise eletroquímica do genossensor frente às diferentes concentrações do genoma de *Leishmania* sp. a) impedância; b) voltametria. Fonte: próprio autor.

Ademais, foi realizado um teste de especificidade, ao expor o sistema à amostra genômica de *S. masoni* foi possível observar que o sensor não foi responsivo, processo este demonstrado pela baixa resposta do diâmetro do semicírculo e falta de alteração

das correntes de pico quando comparado com a resposta da plataforma sensora, como mostra a figura 17.

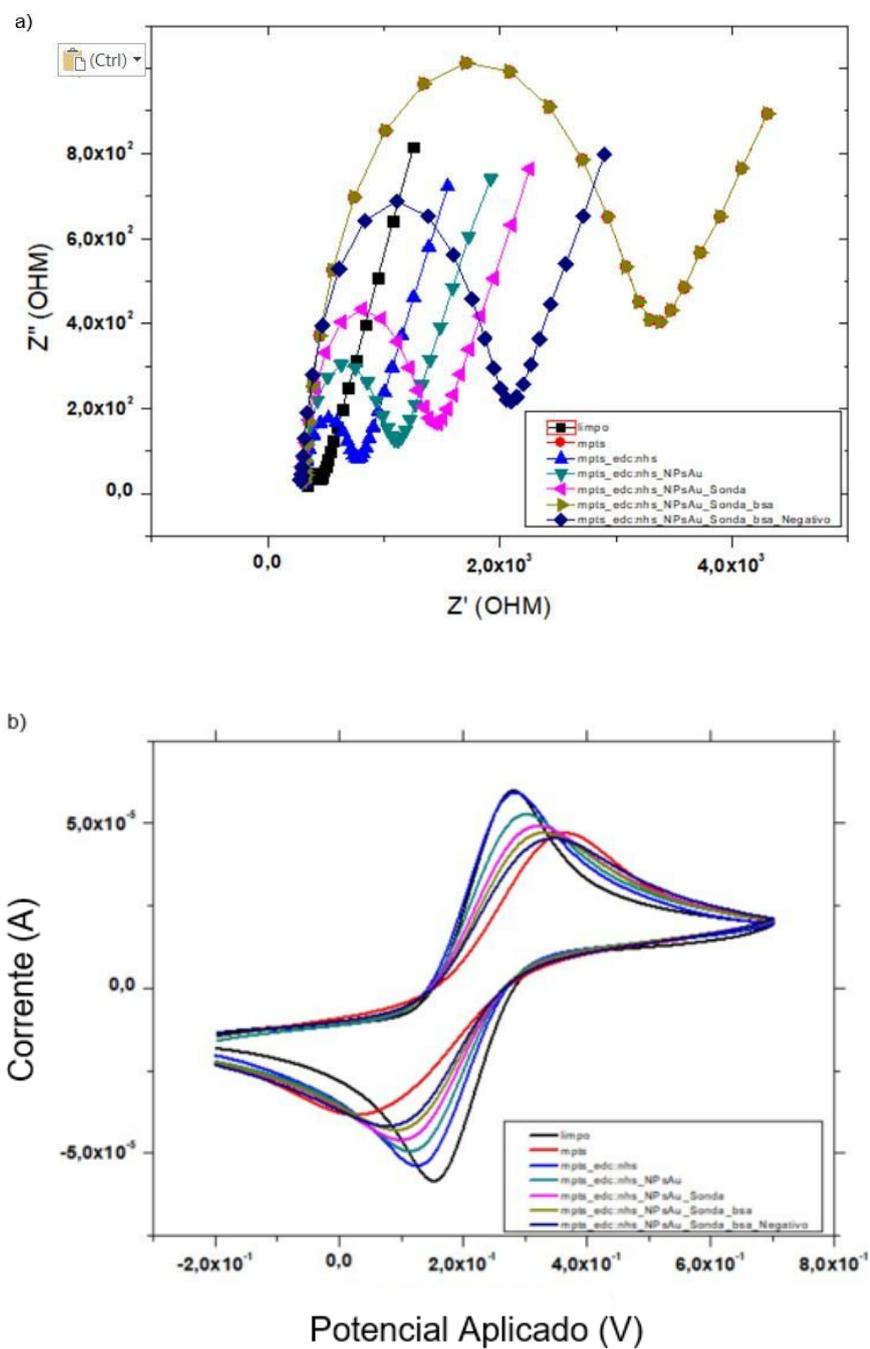


Figura 17. Análise eletroquímica do sistema sensor frente à amostra de *S. mansoni*. a) avaliação impedimétrica; b) avaliação voltamétrica. Fonte: próprio autor.

Em adição, a partir da avaliação do sistema sensor frente às amostras reais de pacientes infectados, demonstrado na figura 18. Foi possível observar um aumento do diâmetro do semicírculo e uma diminuição das correntes de pico anódicas, comprovando a eficiência do sistema na detecção de *L. chagasi* em amostras infectadas.

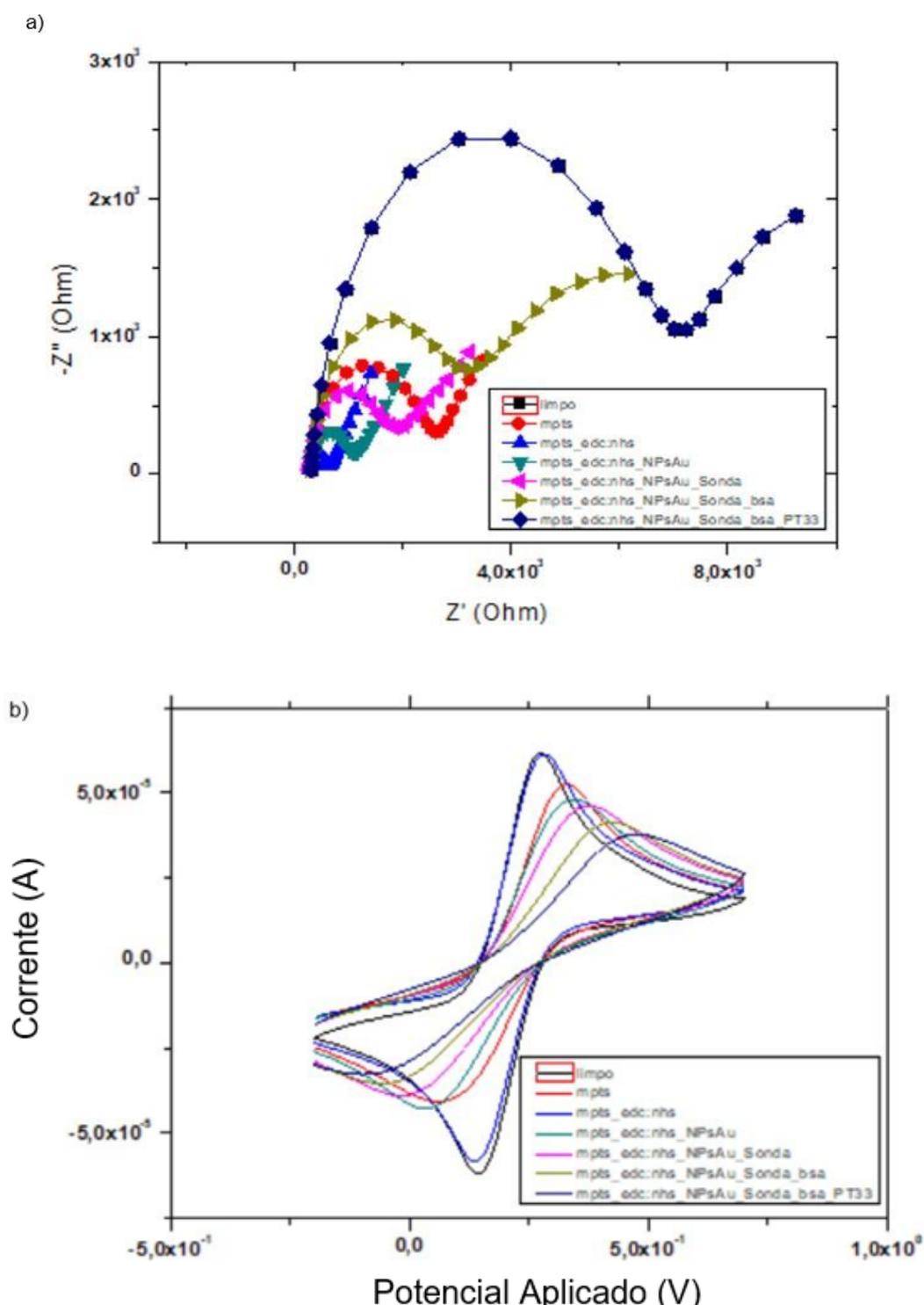


Figura 18. Análise eletroquímica do genossensor em relação a amostra de soro infectado. a) espectroscopia de impedância eletroquímica; b) voltametria cíclica. Fonte: próprio autor.

5.2 ANÁLISES ELETROQUÍMICAS DA SUPERFÍCIE SENSORA PARA *SCHISTOSOMA MANSONI*

A plataforma desenvolvida para detecção do *S. mansoni* foi feita de forma similar à utilizada para a leishmaniose. Para obter o sensor capaz de diagnosticar a esquistossomose, no entanto, foi utilizada uma sonda específica para o *Schistosoma mansoni*.

Como demonstrado anteriormente, com o eletrodo limpo, o diagrama de Nyquist se mostrou limitado e, ao adicionar a camada de MPTS, houve um aumento do semicírculo, comprovando que se obteve resposta na ligação. Ao adicionar o EDC:NHS, há uma diminuição do semicírculo, o que ajuda a estabilizar a plataforma. Com o grupamento tiol do MPTS exposto, a nanopartícula de ouro adicionada, provoca um aumento do semicírculo. Esta resposta indica que a ancoragem de AuNPs sobre o MPTS foi efetiva, aumentando a superfície eletroativa do eletrodo.

Ao seguir a montagem da plataforma, a adição da sDNA_{Schist} provocou um outro aumento no diâmetro do semicírculo no gráfico em decorrência à repulsão eletrostática entre o par redox e a sonda de DNA na superfície do eletrodo. Em seguida, os sítios restantes foram preenchidos através da BSA, sendo evidenciado um novo aumento do semicírculo.

Na avaliação do eletrodo limpo, observa-se um elevado pico anódico, que é diminuído após a adição de MPTS. Em seguida, com a ligação da solução de EDC:NHS, ao estabilizar a plataforma, observa-se um aumento da corrente.

Continuando na montagem da plataforma, quando as NPs_{Au} são adicionadas ao eletrodo, ocorre uma diminuição da corrente de pico e uma nova diminuição é observada quando se adiciona a Sonda específica do *Schistosoma mansoni*. Por fim, mais uma redução foi verificada quando o sistema foi exposto ao BSA para fechar os sítios remanescentes. Foi formada, então, a plataforma sensora MPTS_EDC:NHS_AuNPs_BSA para detecção da neuroesquistossomose, apresentada na figura 19.

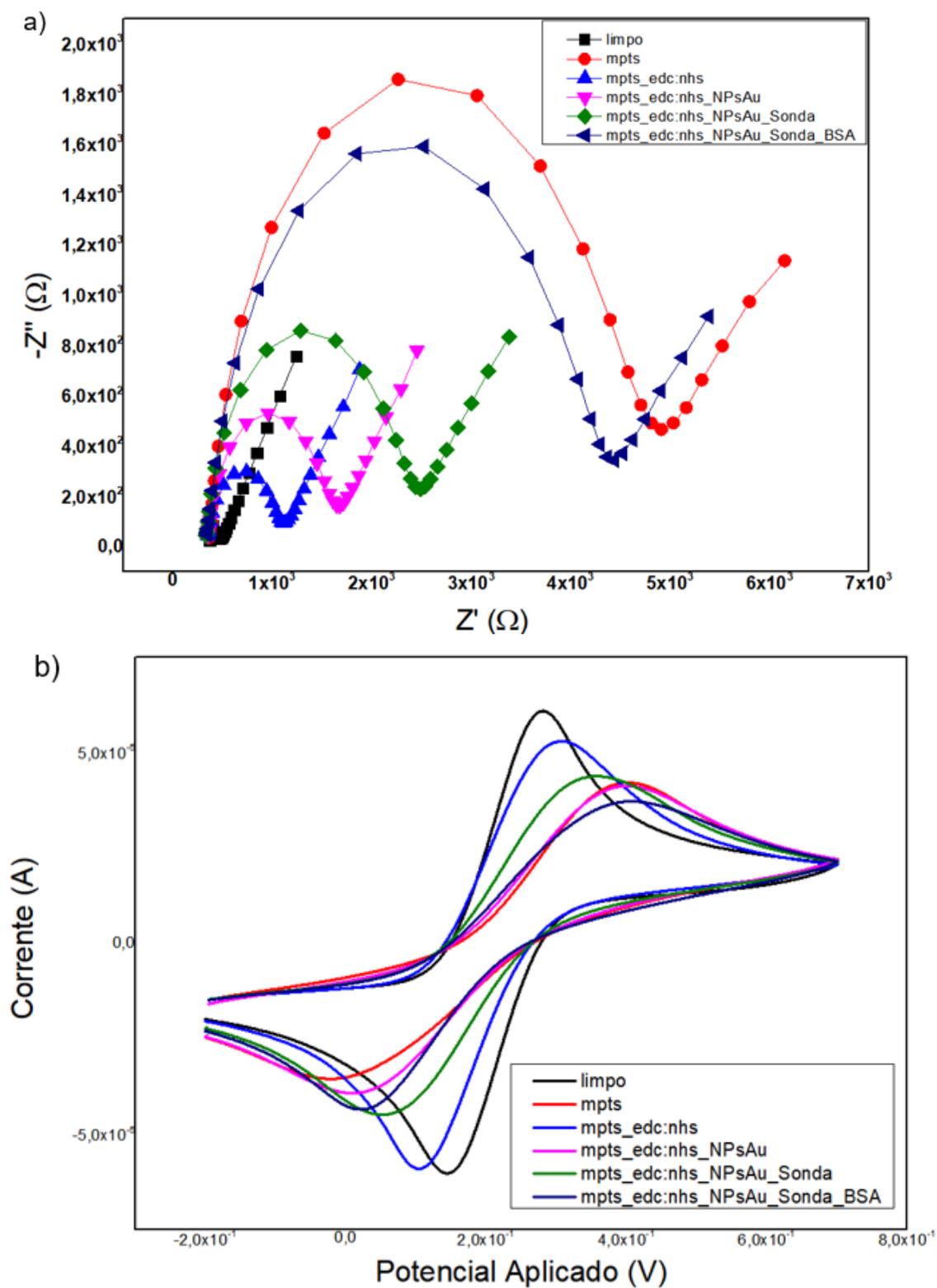


Figura 19. Avaliação eletroquímica das etapas de montagem do genossensor. a) análise impedimétrica; b) análise voltamétrica. Fonte: próprio autor.

Em seguida, como mostrado na figura 20, foi avaliada a bioatividade da plataforma, adicionando DNA complementar, sendo observado um aumento gradativo da impedância total do sistema em diferentes concentrações do analito avaliado, juntamente à diminuição das correntes de pico anódicas, indicando a ocorrência de hibridização e reconhecimento. A partir disso, o sistema foi capaz de responder às diferentes concentrações do genoma do *S. mansoni*, de 2,6 pg/ml⁻¹ até 83,95 pg/ml⁻¹.

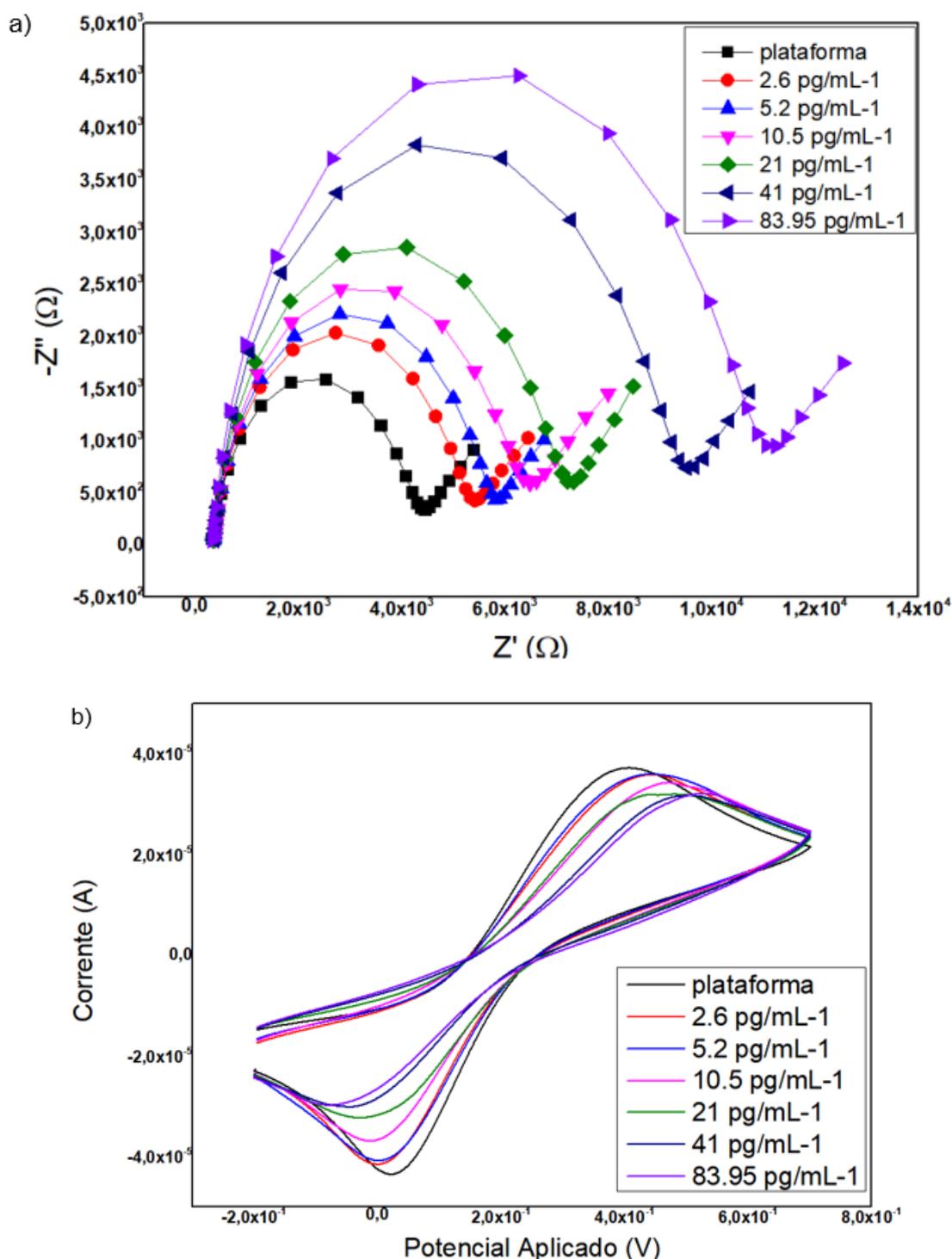


Figura 20. Análise eletroquímica do genossensor frente às diferentes concentrações do genoma de *Schistosoma mansoni*. a) EIE. b) VC. Fonte: próprio autor.

Com isso, foi utilizado o circuito de Randles para análise dos dados de impedância, em que o estudo apresentou uma concordância entre o modelo de circuito equivalente e os resultados. Tal circuito é composto por resistência da solução (R_{sol}), resistência da transferência de carga (R_{ct}), elemento de fase constante (CPE) ou capacitância da dupla camada elétrica (Cdl) e elemento de difusão Warburg (zW), indicados na tabela 1.

Concentração (pg/mL ⁻¹)	Rs (Ohm)	Cdl (nMho)	zW (μMho)	Rct (Ohm)
2,6	357	878	804	4,86
5,2	354	844	850	5,29
10,5	364	809	569	8,85
20,1	348	745	618	6,63
41	361	722	264	8,84
83,95	329	702	521	10,4

Tabela 1. Resultados obtidos através da equação de Randles. Fonte: próprio autor.

Com isto, foi possível avaliar a variação da resistência da transferência de carga (ΔR_{ct}) para obter as informações quantitativas do processo de hibridização do DNA. A equação utilizada

$$\text{foi: } \Delta R_{ct}\% = [R_{ct}(\text{amostra}) - R_{ct}(\text{sensor})] \div R_{ct}(\text{sensor}) \times 100,$$

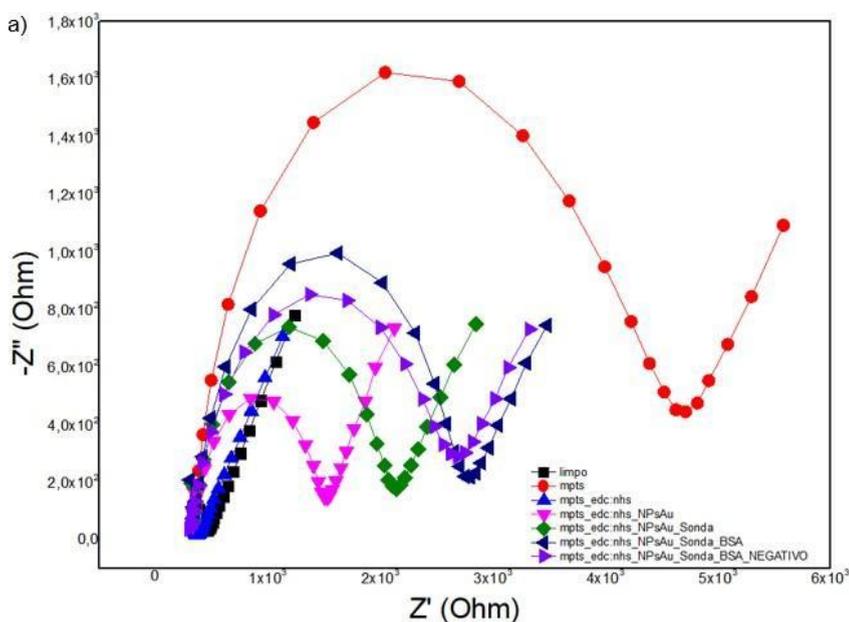
onde $R_{ct}(\text{amostra})$ corresponde à transferência após a hibridização e $R_{ct}(\text{sensor})$ a resistência da transferência de carga do genossensor.

Então, ao calcular os valores do ΔR_{ct} foi possível comprovar o aumento da impedância, observando a progressão dos resultados, de acordo com a concentração do genoma do *Schistosoma mansoni*, como demonstra a tabela 2.

Concentração DNA (pg/mL ⁻¹)	ΔR_{ct} (%)
2,6	24,3
5,2	35,3
10,5	49,6
20,1	69,5
41	126
83,95	166

Tabela 2. Resultados dos cálculos do ΔR_{ct} baseado nas diferentes concentrações do genoma do *S. mansoni*. Fonte: próprio autor.

Em adição, o sensor foi exposto a um material de *Leishmania* sp., a fim de comprovar a sua especificidade para esquistossomose. No experimento, com a plataforma montada, ao ser inserido o material biológico da *Leishmania*, o sensor não foi responsivo, como mostra a figura 21.



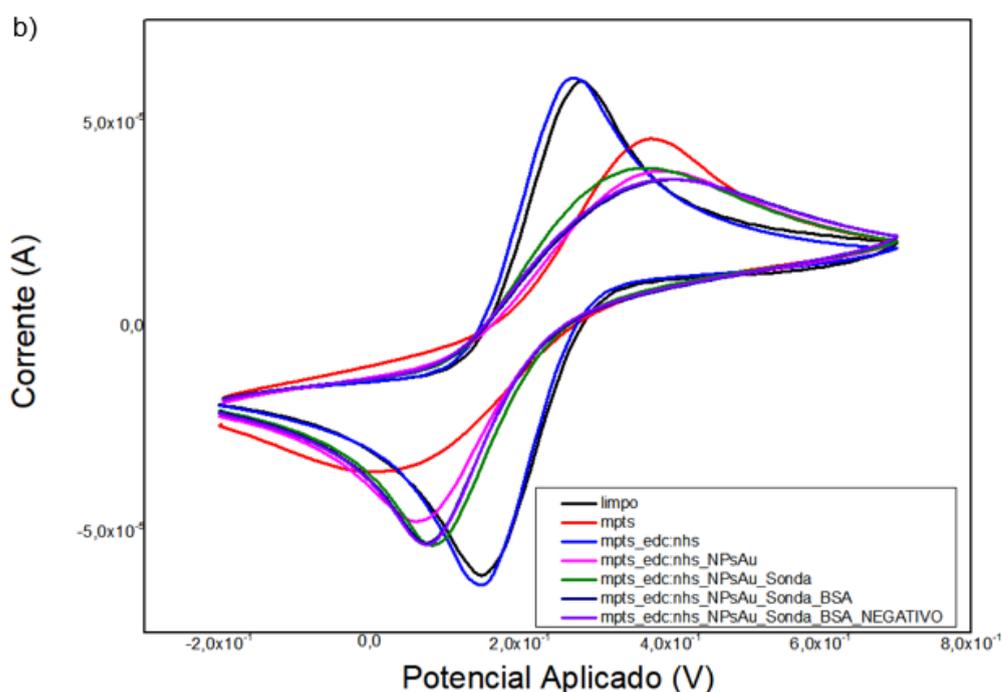


Figura 21. Resposta do genossensor frente amostra de DNA de *Leishmania* sp. a) análise impedimétrica; b) análise voltamétrica. Fonte: próprio autor.

Para a avaliação do genossensor frente às amostras reais, foi realizado teste com amostras de pacientes infectados. A partir da análise do semicírculo, foi possível observar, na figura 22, um aumento do diâmetro do semicírculo, comprovando a eficiência do sistema em detectar amostras infectadas.

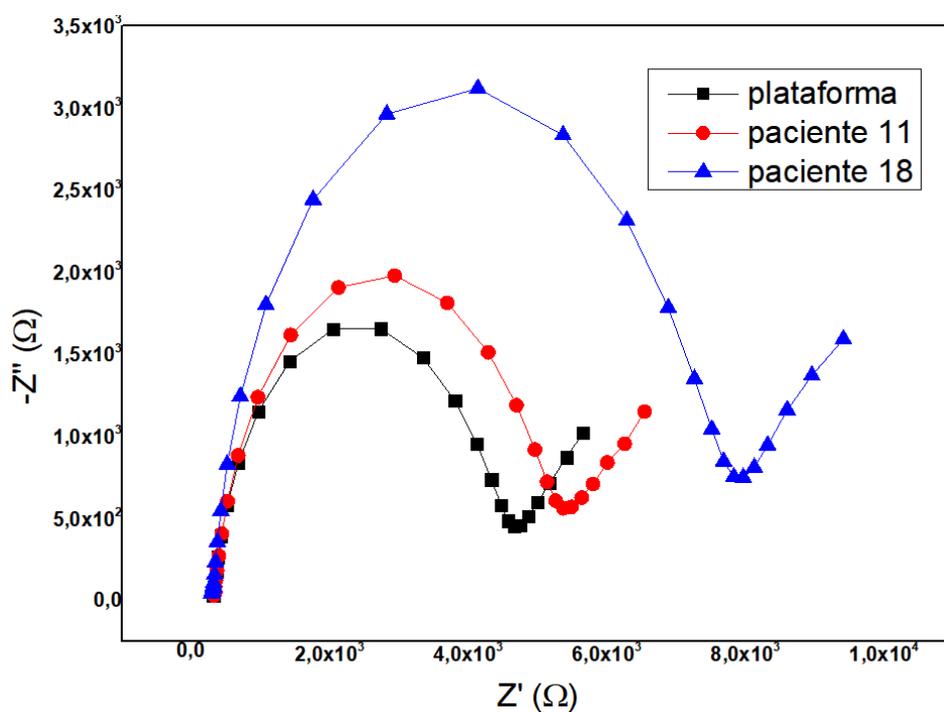


Figura 22. Análise impedimétrica do genossensor em relação a amostra de pacientes infectados. Fonte: próprio autor.

Além disso, também foi feita a avaliação do voltamograma cíclico das amostras dos pacientes, com sua eficácia sendo comprovada através da diminuição das correntes de pico.

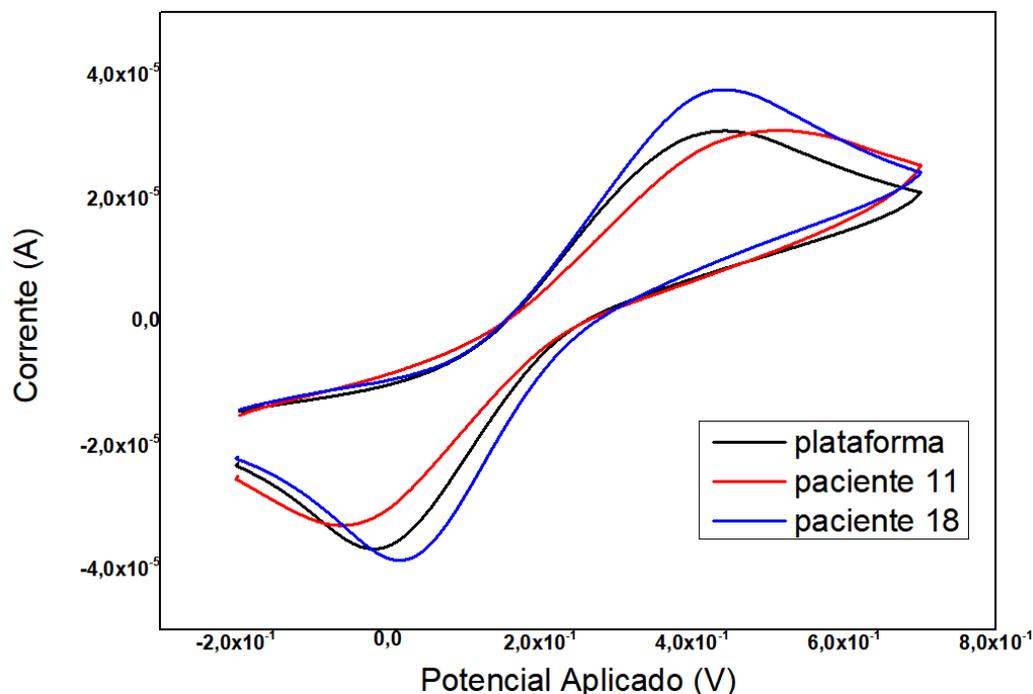


Figura 23. Análise voltamétrica do sensor frente à amostras de pacientes infectados. Fonte: próprio autor.

5.3 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA

A Fig. 24a e b mostra a superfície do eletrodo após modificação com MPTS e AuNPs eletrodepositadas, respectivamente. Superfícies com rugosidade de 97 nm (Figs. 24a) e 0,15 μm (Fig. 24b) foram obtidos, sugerindo uma montagem eficiente das camadas. O MPTS fornece uma rede polimérica 3D com grupos de cauda de tiol que se ligam a superfícies de ouro. Além disso, esta matriz fornece um ambiente biocompatível que preserva a estrutura biológica e atividade após o processo de imobilização. A rede polimérica é essencial para a montagem de AuNPs permitindo a incorporação de uma grande quantidade de biomoléculas que melhoram a sensibilidade do sensor.

A imobilização da sonda de DNA resultou em alterações da rugosidade da superfície de 0,23 μm (Fig. 24c). A interação específica do sensor e amostra de *S. mansoni* foi avaliado, revelando uma alteração significativa na topografia foi observada após a exposição do sistema ao genoma do verme (Fig. 24d). A

avaliação com material não-complementar mostra uma distribuição na superfície do eletrodo com menos agregados (Fig. 2e). Assim, nossos resultados confirmam a especificidade do sensor. A imagem AFM está em boa concordância com os resultados de VC e EIE.

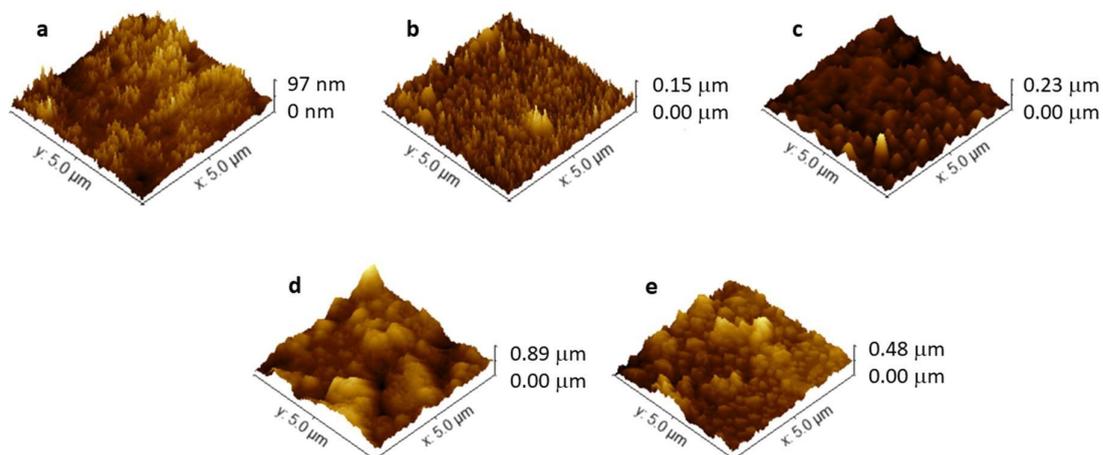


Figura 24. Imagens da microscopia de força atômica para avaliação morfológica do genossensor.

Fonte: próprio autor.

6 CONCLUSÃO

Este trabalho demonstrou que um genossensor baseado em nanopartículas de ouro, modificado com camadas de MPTS e agente de acoplamento EDC:NHS, capaz de identificar a esquistossomose e leishmaniose, foi desenvolvido com sucesso.

As técnicas de impedância, voltametria e as análises microscópicas de AFM, revelaram que as camadas foram imobilizadas corretamente.

O genossensor desenvolvido foi capaz de detectar diferentes concentrações do genoma do *Schistosoma mansoni*, tendo um limite de detecção de 83,95 pg/mL⁻¹. Além disso, também foi capaz de reconhecer diferentes concentrações da *Leishmania* sp., com limite de 1 ng/mL⁻¹.

Ademais, a plataforma se mostrou eficiente quando utilizada para analisar amostras de pacientes infectados.

Atualmente, não existem na literatura muitos trabalhos envolvendo biossensores para estas parasitoses publicados, sendo este trabalho, uma novidade na área.

Por fim, o sensor, além de ser um método de baixo custo, demonstra especificidade e sensibilidade para o diagnóstico da esquistossomose, sendo uma metodologia promissora, visto que, os atuais métodos podem ser invasivos, não específicos e de alto custo

REFERÊNCIAS

ANDRADE, C.A.S., et al. Diagnosis of dengue infection using a modified gold electrode with hybrid organic inorganic nanocomposite and Bauhinia monandra lectin. **Journal of Colloid and Interface Science** (Print), v. 362, p. 517-523, 2011.

ALEXANDER REESE, R., & XU, B. (2018). Single-molecule detection of proteins and toxins in food using atomic force microscopy. **Trends in Food Science & Technology**. doi:10.1016/j.tifs.2018.01.005

AMADOR SALOMÃO, P. E. Production and Application of Biosensors: A Brief Review. **Research, Society and Development**, v. 7, n. 3, p. e1373282, 2018. DOI: 10.17648/rsd-v7i3.282. Disponível em: <<https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/282>>.

AZEVEDO, E. P. **Diagnóstico Coproparasitológico em Laboratório de Análises Clínicas: comparação de técnicas e custo de implantação**. 2016. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2016.

BARBOSA, C. S. et al. Controle de qualidade das lâminas pelo método Kato-Katz para o diagnóstico parasitológico da esquistossomose mansônica. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial** [online]. 2017, v. 53, n. 2, pp. 110-114. Disponível em: <<https://doi.org/10.5935/1676-2444.20170018>>. ISSN 1678-4774.

BENITES ET AL 2014 BENITES, T. A. et al. Efeitos da rugosidade superficial nas propriedades de passivação de monocamadas orgânicas automontadas. **Quim. Nova**, Vol. 37, No. 9, 1533-1537, 2014

BRASIL. Ministério da Saúde. **Vigilância da Esquistossomose Mansonii: Diretrizes Técnicas**. 2014. 4ª edição.

BRASIL. **Sistema de Informação do Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose – SISPCE/SVS/MS**. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Esquistossomose**. 2021. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/e/esquistossomose-1>>.

BUSO, A., et al. Electrochemical removal of tannins from aqueous solutions. **Industrial & Engineering Chemistry Research** 39.2 (2000): 494-499.

CASALINI, S. et al. Self-assembled monolayers in organic electronics. **Chemical Society Reviews** (2017), 46(1), 40–71 doi:10.1039/c6cs00509h

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. 2018. **Schistosomiasis**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/parasites/schistosomiasis/biology.html>>

CESEWSKI, E., JOHNSON, B. N. (2020). Electrochemical biosensors for pathogen detection. **Biosensors and Bioelectronics**, 112214. doi:10.1016/j.bios.2020.112214

CHEN, A.W.Y, et al. An unusually late presentation of neuroschistosomiasis. **Journal of Infection** (2006): 53, 155–158.

CHERAGHI, S. et al. (2017). A nanostructure label-free DNA biosensor for ciprofloxacin analysis as a chemotherapeutic agent: an experimental and theoretical investigation. **New Journal of Chemistry**, 41(12), 4985–4989.

CHEUNG, M.K.L., et al. 5'-Thiolated Oligonucleotides on (3-Mercaptopropyl) trimethoxysilane– Mica: **Surface Topography and Coverage**. *Langmuir* 19.14 (2003): 5846-5850.

CIUCCI, F. (2018). Modeling Electrochemical Impedance Spectroscopy. **Current Opinion in Electrochemistry**. doi:10.1016/j.coelec.2018.12.003

DAS, R. et al. (2014). An electrochemical genosensor for Salmonella typhi on gold nanoparticles-mercaptoposilane modified screen printed electrode. **Journal of Biotechnology**, 188, 9–16. doi:10.1016/j.jbiotec.2014.08.002

DAZZI, A., PRATER, C. B. (2016). AFM-IR: Technology and Applications in Nanoscale Infrared Spectroscopy and Chemical Imaging. **Chemical Reviews**, 117(7), 5146–5173. doi:10.1021/acs.chemrev.6b00448

DICULESCU, V. C., CHIORCEA-PAQUIM, A.-M., & OLIVEIRA-BRETT, A. M. (2016). Applications of a DNA-electrochemical biosensor. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, 79, 23–36. doi:10.1016/j.trac.2016.01.019

EL GOUMI, Y. (2017). Electrochemical Genosensors: Definition and Fields of Application. **International Journal of Biosensors & Bioelectronics**. 3. 10.15406/ijbsbe.2017.03.00080.

FREIRE, R.S., CHRISTIANA A.P., LAURO, T.K. Emprego de monocamadas auto-organizadas no desenvolvimento de sensores eletroquímicos. **Química Nova** 26.3 (2003): 381-389.

FERREIRA, F. T. **Sensibilidade e Especificidade do Teste Rápido na Urina (POC-CCA) e Avaliação da Morbidade da Esquistossomose Mansônica em Região de Baixa Prevalência**. 2016. **Dissertação (Mestrado em Medicina) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2016**.

GOMES, E. C. S. et al. Urban schistosomiasis: An ecological study describing a new challenge to the control of this neglected tropical disease, **The Lancet Regional Health - Americas**, Volume 8, 2022, 100144, ISSN 2667-193X, <https://doi.org/10.1016/j.lana.2021.100144>.

HELI, H. et al. (2016). An electrochemical genosensor for Leishmania major detection based on dual effect of immobilization and electrocatalysis of cobalt-zinc ferrite quantum dots. **Talanta**, 156-157, 172–179. doi:10.1016/j.talanta.2016.04.065

HUAYU Y., et al. A sensitive electrochemical aptasensor for thrombin detection based on exonuclease-catalyzed target recycling and enzyme-catalysis, **Biosensors and Bioelectronics**, Volume 47, 2013, Pages 368-372, ISSN 0956-5663, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.03.045>.

ILBEIGI, S., DEHDARI VAIS, R., SATTARAHMADY, N. (2021). Photo-genosensor for Trichomonas vaginalis based on gold nanoparticles-genomic DNA. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, 34, 102290. doi:10.1016/j.pdpdt.2021.102290

KAUR, B. et al. (2018). Approaching single DNA molecule detection with an ultrasensitive electrochemical genosensor based on gold nanoparticles and cobalt-porphyrin DNA conjugates. **Chemical Communications**. doi:10.1039/c8cc05362f

LIMA, C. et al. Pré-diagnóstico da Esquistossomose no Semiárido: Régua Antropométrica e Aplicativo Colaborativo. **Revista Tecnologia e Sociedade**, Curitiba, v. 15, n. 36, p. 272- 293, abr./jun. 2019. DOI: 10.3895/rts.v15n36.7809.

LIMA, D. **DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS VISANDO A DETECÇÃO DE BIOMARCADORES RELACIONADOS AO CARCINOMA DE CÓRTEX ADRENAL PEDIÁTRICO E À DOENÇA DE ALZHEIMER**. 2020. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2020.

LUNA, D. M. N., et al. Electrochemical immunosensor for dengue virus serotypes based on 4-mercaptobenzoic acid modified gold nanoparticles on self-assembled cysteine monolayers. **Sensors and Actuators B: Chemical** (2015): 220:565–572.

MANZANARES-PALENZUELA, C. L. et al. (2015). Electrochemical genosensors as innovative tools for detection of genetically modified organisms. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, 66, 19–31. doi:10.1016/j.trac.2014.10.006

MOBED, A. et al. (2020). Binding of Leishmania spp with gold nanoparticles supported polyethylene glycol and its application for the sensitive detection of infectious photogenes in human plasma samples: A novel biosensor. **Journal of Molecular Recognition**, e2839. doi:10.1002/jmr.2839

MORAES, R. M. B. P.; Amaral, R. (2015). Neuroesquistossomose. **Revista Brasileira de Neurologia e Psiquiatria**. Ed. Especial. 165-203.

NIU, X. et al. (2017). Electrochemical DNA biosensor based on gold nanoparticles and partially reduced graphene oxide modified electrode for the detection of Listeria monocytogenes hly gene sequence. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, 806, 116–122. doi:10.1016/j.jelechem.2017.10.049

OLIVEIRA, M.D.L., et al. Electrochemical evaluation of lectin–sugar interaction on gold electrode modified with colloidal gold and polyvinyl butyral. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces** 66.1 (2008): 13-19.

OLIVEIRA JUNIOR, J. P. **Neuroesquistossomose: análise secundária de casos brasileiros**. 2013. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Medicina) - Universidade Federal da Bahia, [S. I.], 2013.

PACHECO, W. F. et al. Voltammetry: A Brief Review About Concepts. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 4, p. 516-537, 2013

PARRA-ALFAMBRA, A. M. et al. (2011). New nanostructured electrochemical biosensors based on three-dimensional (3-mercaptopropyl)-trimethoxysilane network. **The Analyst**, 136(2), 340–347. doi:10.1039/c0an00475h

PASHA, A. H. G.; SADEGHI, A. (2020) A fresh study for dynamic behaviour of atomic force microscope cantilever by considering different immersion environments, **Journal of Experimental Nanoscience**, 15:1, 129-149, DOI: 10.1080/17458080.2020.1754398

PESL, M. et al. (2016). Atomic force microscopy combined with human pluripotent stem cell derived cardiomyocytes for biomechanical sensing. **Biosensors and Bioelectronics**, 85, 751–757. doi:10.1016/j.bios.2016.05.073

PIMENTA, K. S. S.; CÔRREA, J. O. A.; MESQUITA, H. L. Neuroesquistossomose: estudo do perfil clínico-patológico e critérios diagnósticos. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais**, v. 2, n. 4, p. 120-125, 11 jul. 2010.

RANDVIIR, E. P., & BANKS, C. E. (2013). Electrochemical impedance spectroscopy: an overview of bioanalytical applications. **Analytical Methods**, 5(5), 1098. doi:10.1039/c3ay26476a

RIBEIRO, D.V., SOUZA, C.A.C. e ABRANTES, J.C.C. Use of Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS) to monitoring the corrosion of reinforced concrete. **Revista IBRACON de Estruturas e Materiais** [online]. 2015, v. 8, n. 4, pp. 529-546. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1983-41952015000400007>>. Epub Jul-Aug 2015. ISSN 1983-4195.

SANTOS, E.C. dos, et al. Per. II Clínico e Critérios Diagnósticos da Mielorradiculopatia Esquistossomótica. *Arquivos de Neuropsiquiatria* 59.3-B (2001): 772-777.

SANTOS, G. S. et al.. Label-free nanostructured biosensor for *Schistosoma mansoni* detection in complex biological fluids. 2019. **Talanta**, 204, 395–401. doi:10.1016/j.talanta.2019.05.111

SILVA, D. P. et al. Desenvolvimento de um potenciostato de baixo custo para ser empregado em aulas experimentais de Eletroquímica. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 12, p. 100050-100057, 2020.

SILVA, E. M., et al. (2021) Mortalidade por Esquistossomose Mansonii no Estado de Pernambuco no Período 2011 a 2019. **Práticas e Cuidados: Revista de Saúde Coletiva**. Salvador, v.2, n.e 11210, p.1-19, 2021.

SILVEIRA-LEMOS, D. et al. "Cytokine Pattern of T Lymphocytes in Acute Schistosomiasis mansoni Patients following Treated Praziquantel Therapy." **Journal of parasitology research**, vol. 2013 (2013): 909134. doi:10.1155/2013/909134

SIQUEIRA, L. M. V. et al. (2015). Evaluation of parasitological and molecular techniques for the diagnosis and assessment of cure of schistosomiasis mansoni in a low transmission area. **Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz**, 110(2), 209–214. doi:10.1590/0074-02760140375

SHARIATI, M. et al. (2018). An ultrasensitive label free human papilloma virus DNA biosensor using gold nanotubes based on nanoporous polycarbonate in electrical alignment. **Analytica Chimica Acta**. doi:10.1016/j.aca.2018.09.062

SOYSALDI, F., & SOYLU, M. Ç. (2021). The Effect of (3-Mercaptopropyl)trimethoxysilane (MPS) Coating on the Genetic Detection Performance of Quartz Crystal Microbalance-Dissipation (QCM-D) Biosensor: Novel Intact Double-Layered Surface Modification on QCM-D. **ChemistrySelect**, 6(24), 6056–6062. doi:10.1002/slct.202100739

STEVANATTO, L. C., BRUSAMARELLO, V. J., & TAIROV, S. (2014). Parameter Identification and Analysis of Uncertainties in Measurements of Lead–Acid Batteries. **IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement**, 63(4), 761–768. doi:10.1109/tim.2013.2283545

TEIXEIRA, A. C. Q. Material de Apoio. Esquistossomose. **Diagnóstico**. 2014. Disponível em:
<<https://www.ufjf.br/labproteinas/material-de-apoio/esquistossomose/diagnostico/>>

TIWARI, I. et al. (2015). Electrochemical detection of a pathogenic Escherichia coli specific DNA sequence based on a graphene oxide–chitosan composite decorated with nickel ferrite nanoparticles. **RSC Advances**, 5(82), 67115–67124. doi:10.1039/c5ra07298k

VITORINO, R. R. et al. Schistosomiasis mansoni: diagnosis, treatment, epidemiology, prophylaxis and control. **Rev Bras Clin Med. São Paulo**, 2012 jan-fev;10(1):39-45

WANG, Q., NANGIANG, L. Electrocatalytic response of norepinephrine at a thiolactic acid self-assembled gold electrode. *Talanta* 55.6 (2001): 1219-1225.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. (2010). **Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: first WHO report on neglected tropical diseases**. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44440>

WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2022. **Schistosomiasis**. Disponível em:
<<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/schistosomiasis>>

WU, J. et al. (2015). Inkjet-printed microelectrodes on PDMS as biosensors for functionalized microfluidic systems. **Lab on a Chip**, 15(3), 690–695. doi:10.1039/c4lc01121j

XUE, D., et al. Indirect electrochemical sensing of DNA hybridization based on the catalytic oxidation of cobalt (II). **Journal of the American Chemical Society** 129.7 (2007):1854-1855.

ZHANG, Y., ZHANG, K., & MA, H. (2009). Electrochemical DNA Biosensors Based on Gold Nanoparticles / Cysteamine / Poly(glutamic acid) Modified Electrode. **American Journal of Biomedical Sciences**, 115-125.

Zhu, C., Yang, G., Li, H., Du, D., & Lin, Y. (2014). Electrochemical Sensors and Biosensors Based on Nanomaterials and Nanostructures. **Analytical Chemistry**, 87(1), 230–249. doi:10.1021/ac5039863