



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE BIOCÊNCIAS

PROGRAMA DE PÓS- GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSOR IMPEDIMÉTRICO PARA
DETECÇÃO DE *Schistosoma mansoni* BASEADO EM NANOCOMPÓSITO DE
ÓXIDO DE FERRO E OURO**

GISELLE SOARES DOS SANTOS

RECIFE

2016

GISELLE SOARES DOS SANTOS

DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSOR IMPEDIMÉTRICO PARA DETECÇÃO
DE *Schistosoma mansoni* BASEADO EM NANOCOMPÓSITO DE ÓXIDO DE
FERRO E OURO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Biológicas como pré-requisito parcial para obtenção do
título de mestre em Ciências Biológicas pela Universidade
Federal de Pernambuco.

Orientado por: Prof^a. Dr^a. Maria Danielly Lima de Oliveira

RECIFE

2016

DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSOR IMPEDIMÉTRICO PARA DETECÇÃO
DE *Schistosoma mansoni* BASEADO EM NANOCOMPÓSITO DE ÓXIDO DE
FERRO E OURO

Dissertação apresentada como pré-requisito parcial
para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas pela Universidade
Federal de Pernambuco

Aprovada em: 29/02/2016

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Maria Danielly Lima de Oliveira (Departamento de Bioquímica/UFPE) –
Orientadora

Prof. Dr. César Augusto Souza de Andrade (Departamento de Bioquímica/UFPE) - 1º
examinador

Prof. Dr. Kleber Gonçalves Bezerra (Departamento de Engenharia Mecânica/UFPE) - 2º
examinador

Aos meus pais, Cícero e Marli pelo apoio e incentivo em todas as minhas escolhas.

Ao meu esposo Romero pelo amor, apoio, confiança e motivação incondicional.

A eles dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Bom Deus que me permitiu chegar até aqui, me dando forças e saúde para superar as dificuldades e por conceder-me incontáveis bênçãos.

Aos meus pais Cícero e Marli, pelo exemplo que são, pelos valores que me ensinaram, pelo apoio incondicional, e por acreditarem em mim.

Ao meu esposo Romero Bomfim por ser tão importante na minha vida. Sempre ao meu lado, me pondo para cima e me fazendo acreditar que posso mais que imagino. Pelo carinho, pela ajuda, paciência e compreensão nos momentos de dificuldade e ausência. Você me traz paz nas horas de turbulência.

A minha família em especial meus amados irmãos e sobrinhos pelo apoio e amor em todos os momentos.

A minha orientadora Prof. Dra. Maria Danielly Lima de Oliveira, pela oportunidade, por acreditar em mim, pelos ensinamentos, compreensão e por me orientar de uma forma tão atenciosa. Obrigada também pela amizade e carinho. Aprendi muito com você.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Cesar Augusto Souza de Andrade, agradeço também pela oportunidade, apoio, suporte e ensinamentos.

Ao nosso colaborador Fábio Lopes de Melo pelo material cedido para que este trabalho fosse desenvolvido.

As minhas amadas amigas Flávia Garcia, Maurília Palmeira e Karen Yasmin por todo apoio, pelas palavras de incentivo, por fazer a caminhada mais leve e divertida, amo muito vocês. Aos poucos nos tornamos mais que amigas quase irmãs... Obrigada por dividir comigo as angústias e alegrias. O mestrado não seria o mesmo sem vocês.

As minhas queridas amigas Juliana Miranda e Kalline Lourenço, pelo carinho, companherismo e momentos de descontração. Foi bom poder contar com vocês.

Agradeço a todos do grupo Laboratório de Biodispositivos Nanoestruturados-

BIONANO /UFPE - Thaynara, Gabriel, Rafael, Gustavo, Elton, Estefani, Sandra, Felipe, Raiza, Erico, Thays, Isaac, Alberto, por toda ajuda, amizade e momentos de descontração.

Aos docentes e funcionários do Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas/UFPE

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica/UFPE.

A FACEPE pelo apoio financeiro.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para a conclusão deste trabalho, que mesmo não sendo citados tiveram um papel relevante na realização deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos.

“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana.”

Carl Jung

RESUMO

A esquistossomose é um sério problema de saúde pública, é uma doença negligenciada e intimamente relacionada com baixos índices de desenvolvimento social. Neste trabalho, foi realizada uma detecção eletroquímica de DNA *Schistosoma mansoni* com base em uma monocamada auto-montada de ácido mercaptobenzóico (MBA) imobilizando nanoestruturas compostas por nanopartículas de ouro (AuNPs) e nanopartículas de magnetita (Fe₃O₄-NPs). Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) e voltametria cíclica (CV) foram utilizadas para monitorar o evento de bioreconhecimento do sistema de MBA-Fe₃O₄-NPs-AuNPs-DNAsonda revela uma resposta eletroquímica eficaz indicando a modificação da superfície. O biosistema proposto foi capaz de reconhecer sequências de nucleótidos específica de *S. mansoni* presente em amostras de soro e líquido cefalorraquidiano (LCR) em diferentes concentrações de DNA do genoma. O resultado do bioreconhecimento gerou um aumento na resistência de transferência de elétrons e uma diminuição dos picos de corrente em concentrações de DNA durante as medições eletroquímicas. A plataforma desenvolvida mostrou um limite de detecção do DNA de 0,781 e 0,685 pg.µL⁻¹ para soro e LCR respectivamente. Portanto, o biossensor obtido pode ser considerado como um instrumento útil para a detecção específica de *S. mansoni* em baixas concentrações em vários fluidos biológicos.

PALAVRAS CHAVES: Biossensores, Esquistossomose, DNA, Voltametria cíclica, Impedância eletroquímica, Nanopartículas.

ABSTRACT

Schistosomiasis is a neglected disease closely related to the low levels of social development and a serious public health problem. In this work, we performed an electrochemical detection of *Schistosoma mansoni* DNA with a self-assembled monolayer of mercaptobenzoic acid (MBA) immobilizing nanostructures composed by gold nanoparticles (AuNPs) and magnetite nanoparticles (Fe₃O₄-NPs). Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS) and Cyclic Voltammetry (CV) were used to monitor the biorecognition event. MBA-Fe₃O₄-NPs-AuNPs-DNAprobe system reveals an effective electrochemical response indicating the surface modification. The proposed biosystem was capable to recognize specific nucleotide sequence of *S. mansoni* present in cerebrospinal fluid (CFS) serum samples at different genome DNA concentrations. The biorecognition results in an increase in the electron transfer resistance and a decrease of the current peaks at higher DNA concentrations during electrochemical measurements. The developed platform showed a DNA detection limit of 0.781 and 0.685 pg.μL⁻¹ for serum and CFS, respectively. Therefore, the obtained biosensor can be considered as a useful tool for specific detection of *S. mansoni* at low concentrations in various biological fluids.

KEYWORDS: Biosensors, Schistosomiasis, DNA, Cyclic voltammetry, Electrochemical impedance spectroscopy, Nanoparticles.

LISTA DE FIGURAS DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1 Caramujos hospedeiros intermediários da esquistossomose	22
Figura 2 Ciclo de transmissão parasitária da esquistossomose.....	23
Figura 3 Distribuição da esquistossomose, de acordo com o percentual de positividade por município. Brasil, 2013.....	25
Figura 4 Manifestação hepatoesplênica da esquistossomose.....	27
Figura 5 Manifestação cutânea da esquistossomose.....	28
Figura 6 Ciclo de transmissão parasitária da esquistossomose.....	29
Figura 7 Representação esquemática de um biossensor.....	33
Figura 8 Esquema ilustrativo do acoplamento das bases nitrogenadas que compõe o DNA. Sítios de oxidação e redução nas moléculas de guanina, citosina e adenina.....	42
Figura 9 Diferentes abordagens para biossensores fluorescentes à base de NPs metálicas.....	45
Figura 10 Aplicações biomédicas das nanopartículas magnéticas.....	47
Figura 11 Representação esquemática de uma monocamada auto-montada: (1) grupo cabeça/âncora, (2) cauda e (3) grupo funcional.....	49
Figura 12 Representação esquemática de uma Célula eletroquímica com três	

eletrodos (1) eletrodo de trabalho; (2) eletrodo de referência e (3) eletrodo auxiliar.....50

Figura 13 Representação esquemática de um voltamograma cíclico típico mostrando os parâmetros obtidos por esta técnica: (ipa) corrente de pico anódica, (ipc) corrente de pico catódica, (Epa) potencial de pico anódico e (Epc) potencial de pico catódico, potencial de inversão.....51

Figura 14 Diferentes reversibilidades de sistemas avaliados por voltametria cíclica: sistema reversível, quase irreversível e irreversível.....53

Figura 15 Diagrama de nyquist- aspecto geral da Impedância Eletroquímica.....55

Figura 16 Circuito equivalente de Randles para uma interface eletrodo\solução.56

Figura 17 Microscópio de Força Atômica.....58

LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO

Figure 1 Schematic representation of the surface modification process of the biosensor.....108

Figure 2 Micrographs of scanning electron microscopy (SEM) of the assembly process the MBA-Fe₃O₄_NPs-AuNPs-DNAprobeS.mansoni. a) MBA-Fe₃O₄_NPs-AuNPs self-assembled; b) MBA-Fe₃O₄_NPs-AuNPsDNAprobeS.mansoni, c) Molecular hybridization process-MBA-Fe₃O₄_NPs-AuNPs-DNAprobeS.mansoni-genome, d) MBA-Fe₃O₄_NPs-AuNPs-DNAprobeS.mansoni-genome negative.....108

Figure 3 Cyclic voltammograms of the surface stepwise modification process of the biosensor (a) and CVs at different stages of biorecognition process: Bare gold electrode (—), MBA-Fe₃O₄_NPs-AuNPs-probeS.mansoni (—), MBA-NpFe₃O₄_NPs-AuNPs-probeS.mansoni-genome (—). Cyclic voltammetry scan was initiated at - 0.2 V vs. Ag/AgCl in positive direction at 50 mV.....109

Figure 4 Nyquist plots (a) immobilization process layer-layer electrode: (■) without modification electrode, (●) electrode modified with MBA, (▲) MBA-EDC/NHS, (▼) MBA-Fe₃O₄_NPs-AuNPs, (◆) MBA-Fe₃O₄_NPs-AuNPs-DNAprobeS.mansoni and (◆) MBA-Fe₃O₄_NPs-AuNPs-DNAprobeS.mansoni-genome. (b) Sensor system response when exposed to different concentrations of target genomic DNA and a negative control with the respective simulated by Randles circuit : (■) Bare gold electrode, (■)MBA-Fe₃O₄_NPs-AuNPs-DNAprobeS.mansoni, (■) MBA-Fe₃O₄_NPs-AuNPs-DNAprobeS.mansoni, (■) Sensor-Schistosome-genome (0.5ng/mL), (■)Sensor-Schistosome-genome (0.25ng/mL), (■)Sensor-Schistosome-genome (0.625ng/mL), (■)Sensor-Schistosome-genome (0.031ng/mL), (■)Sensor-Schistosome-genome (0.016ng/mL), (■) Sensor-Schistosome-genome (0.0078ng/mL), (■) Sensor-Schistosome-genome negative, (—). Equivalent circuit (c). □RCT% of the sensor system after exposure to different concentrations of genomic DNA target of Schistosome.....110

Figure 5 (a) Nyquist plots of the sensor and its interaction with System-CSFgenome at different concentrations with respective simulated data by the Randles circuit: (■) Bare gold electrode, (▲) MBA-Fe₃O₄-NPs-AuNPs-DNAprobe_{S.mansoni}, (◆) System-CSFgenome 0.5pg, (×) System-CSFgenome 5.0pg, (●) System-CSFgenome 50.0pg, (▼) System-CSFgenome 0.5ng. (b) Equivalent circuit. Supporting electrolyte: 10 mM [Fe(CN)₆]⁴⁻ / [Fe(CN)₆]³⁻ 1:1 + 0.15 M NaCl in 10 mM PBS (pH 7.4) solution. In the frequency range from 100 mHz to 100 kHz and (c) Θ as a function of concentration of DNA CSF target.....112

LISTA DE TABELAS DO ARTIGO

Table 1 Values of the equivalent circuit elements from fitted impedance results.....105

Table 2 Relative charge transfer variation from impedance data.....105

‘

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Fe ₃ O ₄ _NPs	Nanopartículas de óxido de ferro
AuNPs	Nanopartículas de ouro
Cdl	Capacitância da dupla camada (F)
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês desoxyribonucleic acid)
E	Potencial (V)
EIE	Espectroscopia de Impedância Eletroquímica
ipa	Corrente de pico anódica (A)
ipc	Corrente de pico catódica
Epa	Potencial de pico anódico
Epc	Potencial de pico catódico
SAM	Camadas automontadas
NSM	Neuroesquistossomose mansônica
PCR	Reação em cadeia da Polimerase (do inglês polymerase chain reaction)

RNA	Ácido ribonucleico (do inglês ribonucleic acid)
R_{ct}	Resistência à transferência de elétron (Ω)
R_{Ω}	Resistência ôhmica (Ω)
$\Delta R_{ct}\%$	Percentual relativo da variação à transferência de carga
AFM	Microscopia de força atômica (do inglês atomic-force microscopy)
VC	Voltametria cíclica
Z	Impedância (Ω)
Z_f	Impedância faradaica (Ω)
Z_{im}	Parte Imaginária ou componente capacitiva (Ω)
Z_{re}	Parte Real ou componente resistiva (Ω)
Z_W ou W	Impedância de Warburg

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 ESQUISTOSSOMOSE.....	20
2.1.1 <i>Ciclo de transmissão Parasitária</i>	21
2.1.2 <i>Epidemiologia</i>	23
2.1.3 <i>Sintomas</i>	26
2.1.4 <i>Formas ectópicas</i>	27
2.1.5 <i>Diagnóstico da Esquistossomose</i>	30
2.1.6 <i>Tratamento</i>	32
2.2 BIOSSENSORES	32
2.2.1 <i>Classificação dos Biossensores</i>	34
2.2.1.1 <i>Biossensor Eletroquímico</i>	35
2.2.1.2 <i>Biossensor Óptico</i>	38
2.2.1.3 <i>Biossensor Piezoelétrico</i>	38
2.3 BIOSSENSORES PARA SCHISTOSOMA	40
2.4 GENOSENSORES	41
2.5 NANOPARTÍCULAS	43
2.5.1 <i>Aplicações de Nanopartículas em Biossensores</i>	44
2.5.2 <i>Nanopartículas tipo Magnetita</i>	46
2.5.3 <i>Nanopartículas de Ouro</i>	48
2.5.4 <i>Modificação de superfície do transdutor</i>	48
2.6 TÉCNICAS ELETROANALÍTICAS	50
2.6.1 <i>Voltametria Cíclica</i>	50
2.6.2 <i>Espectroscopia de Impedância Eletroquímica</i>	54
2.7 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA	57
3. OBJETIVOS	59
3.1 OBJETIVO GERAL	59
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	59
4. METODOLOGIA	60
4.1 MATERIAIS.....	60

4.2 PREPARAÇÕES DAS AMOSTRAS.....	60
4.3 SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS.....	61
4.4 MODIFICAÇÃO DO ELETRODO	61
4.5 ANÁLISE DE HIBRIDIZAÇÃO	62
4.6 MEDIDAS ELETROQUÍMICAS	62
4.7 MEDIÇÕES DE MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA	63
5. CONCLUSÃO.....	64
6. PERSPECTIVAS.....	65
REFERÊNCIAS	66
APÊNDICE A - ARTIGO CIENTÍFICO.....	87
ANEXO A – PEDIDO DE PATENTE	114
ANEXO B – NORMAS DA REVISTA	116

1. INTRODUÇÃO

No decorrer de sua evolução o *Schistosoma* resistiu às pressões seletivas impostas por diversos fatores, tais como mudanças climáticas e ambientais, além de significativas variações no tamanho da população de seus hospedeiros intermediário e definitivo. Atualmente, mudanças no nível de desenvolvimento social humano involuntariamente tem favorecido a proliferação desta parasitose, aumentando as chances de infecção e prevalência da doença (Rollinson et al., 2013). A estreita relação com a pobreza, o isolamento geográfico, a estigmatização, o baixo interesse político bem como a falta de uma estrutura de financiamento global estabelecida no combate à doença são alguns dos fatores que explicam o abandono geral da esquistossomose e outras doenças tropicais negligenciadas em geral (Molyneux 2008; Weiss, 2008; Gray et al., 2010).

Existem seis espécies de *Schistosoma* capazes de parasitar os seres humanos: *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma mekongi*, *Schistosoma malayensis* e *Schistosoma intercalatum*, sendo as três primeiras as de maior ocorrência. Destas seis espécies, somente o *S. mansoni* vive nas Américas do Sul e Central. A inexistência de hospedeiros intermediários susceptíveis a infecção impossibilita a existência das outras espécies nestes locais (Gryseels et al., 2006; Davis, 2009; Brasil, 2014).

Do ponto de vista de saúde pública, a esquistossomose é considerada a mais importante doença à base de água, ou seja, transmitida a partir do contato com água contaminada. No Brasil uma média de 101.293 portadores de *S. mansoni* foram identificados por meio de inquéritos coproscópicos. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se que 200-209 milhões de pessoas no mundo estejam infectadas e que 600-779 milhões correm risco de serem infectadas em países endêmicos (WHO, 2013; Utzinger et al., 2009; Rollenberg, 2011; Brasil, 2014). Porém estes números podem não corresponder à realidade já que as técnicas de diagnóstico atuais não apresentam sensibilidade elevada na detecção de infecções leves (King, 2010). Daí faz-se necessário o desenvolvimento e implementação de metodologias mais eficazes para o diagnóstico

da esquistossomose, que possuam elevada sensibilidade e especificidade que serão necessárias em programas de controle e eliminação desta doença (Utzinger et al., 2011).

A esquistossomose ocorre de forma endêmica em vários estados brasileiros, dentre eles Pernambuco. Além do adoecimento, o risco de óbito por esquistossomose é bastante relevante. Atualmente considerada como grave problema de saúde pública estando o seu combate incluso no Programa de Enfrentamento às Doenças Negligenciadas – SANAR (Pernambuco, 2015). O desenvolvimento de novas metodologias diagnósticas para a esquistossomose visa contribuir com a estratégia de eliminação desta patologia.

Desta forma, os biossensores apresentam-se como importantes ferramentas para complementar as técnicas de diagnóstico existentes, graças às suas características exclusivas, tais como: seletividade, relativo baixo custo de desenvolvimento e armazenagem, potencial para miniaturização, facilidade de automação além da possibilidade de construção de dispositivos simples e portáteis (Rosato et al., 2001). Eles conjugam um componente biológico, que interage com um elemento alvo, a um transdutor que transforma os processos de biorreconhecimento em sinais elétricos mensuráveis (Wang, 2000; Pathak et al, 2007).

Os biossensores são dispositivos capazes de detectar rapidamente substâncias químicas e/ou biológicas, tanto qualitativa quanto quantitativamente, já que este dispositivo responde seletiva e reversivelmente, produzindo um sinal elétrico cuja intensidade depende da concentração da amostra (Alfaya, 2008).

O desenvolvimento de biossensores eletroquímicos de hibridização DNA tem atraído esforços de investigação consideráveis nos últimos anos (Palecek, 2009). Com o advento da nanociência e da nanotecnologia, o uso de nanomateriais no desenvolvimento de sensores eletroquímicos de DNA tem se tornado uma prática frequente, já que o uso destes nanomateriais imprime uma melhora significativa no desempenho destes biossensores, oferecendo excelentes perspectivas para a concepção de novos sistemas sensores (Bonanni, 2010; Shi et al., 2014). Isto se dá pelas

propriedades únicas de materiais em escala nanométrica que apresentam excelentes possibilidades de uso na interface de eventos de reconhecimento biológicos com transdução de sinal eletrônico (Malik et al., 2013).

Diferentes métodos de modificação de eletrodo são utilizados para aumentar a sua sensibilidade e especificidade atenuando assim os inconvenientes inerentes na detecção do analito. Biossensores possuem a capacidade para diminuir o intervalo de tempo entre a adsorção da amostra e obtenção dos resultados, especialmente quando tais dispositivos são combinados com os nanomateriais (Suárez et al., 2013). As nanopartículas de ouro têm a capacidade de estabelecer uma imobilização estável de biomoléculas, por conseguinte, uma grande vantagem para a preparação de biossensores. Além disso, o uso de nanopartículas de ouro dispensa a o uso de mediadores de transferência de elétrons, uma vez que permitem a transferência eletrônica direta entre a amostra analisada e a superfície do eletrodo (Pingarrón et al., 2008).

Neste sentido, o desenvolvimento de genossensores impedimétricos para detecção de *Schistosoma* em diferentes fluidos biológicos é de fundamental importância, pois possibilita o diagnóstico precoce da doença e consequentemente a diminuição de sua evolução para as formas mais graves.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Esquistossomose

Também conhecida como “bilharziose”, “Xistose”, “Barriga d’água” e “Doença dos Caramujos” a esquistossomose é uma doença infecciosa granulomatosa. A primeira citação da doença foi feita por Teodor Bilharz em 1851 (Carvalho et al., 2008a; Brasil, 2009). É uma doença tropical negligenciada debilitante, considerada uma das mais graves infecções parasitárias do mundo (Radwa et al., 2014). No Brasil a única espécie encontrada é o *Schistosoma mansoni*, que coloniza o sistema portal humano. Acredita-se que cerca de 25 milhões de pessoas vivem em áreas endêmicas no Brasil e 4 a 6 milhões está infectada, a maioria destas áreas estão localizadas nos estados do Nordeste (Lambertucci, 2010; Brasil, 2013). Os focos de contaminação ocorrem predominantemente em áreas rurais, e em comunidades pobres das periferias das grandes cidades, onde o saneamento básico é precário ou inexistente e os dejetos são lançados diretamente em córregos que alimentam rios e lagos que se tornam assim ambiente propício para a proliferação dos caramujos (Vitorino et al., 2012).

A esquistossomose tem grande importância nas discussões sobre saúde em todo o mundo devido a sua abrangência espacial e continental. Ocupa a segunda posição no ranking das doenças tropicais, perdendo apenas para a malária, apresentando altos índices de morbidade. É considerada uma doença insidiosa e incapacitante em idades precoces, porém raramente fatal e está relacionada principalmente à ausência ou a precariedade de saneamento básico (WHO, 2008).

A morbidade da doença, representada principalmente pelas formas mais graves, está associada, entre outros fatores, à intensidade e duração da infecção e à resposta imune do hospedeiro aos antígenos do parasito (Coura e Amaral, 2004; Jesus, 2004; Lambertucci, 2005). A carga parasitária, por sua vez, é influenciada pelo grau de contato com a água, reflexo das condições socioeconômicas e culturais da população. Deve-se observar ainda que a morbidade da doença pode acarretar prejuízos tanto à cognição e

desenvolvimento intelectual das crianças infectadas quanto à produtividade dos trabalhadores (Rollemberg, 2008).

2.1.1 Ciclo de transmissão Parasitária

O agente etiológico da esquistossomose mansônica, é o *S. mansoni*. É um helminto da classe dos Trematoda, família Schistosomatidae e gênero Schistosoma. São organismos digenéticos, finos, esbranquiçados e dióicos, durante o acasalamento a fêmea adulta, mais alongada, encontra-se inserida em uma fenda do corpo do macho, chamada de canal ginecóforo. Os indivíduos adultos habitam os vasos mesentéricos do hospedeiro definitivo e suas formas intermediárias se desenvolvem em caramujos gastrópodes aquáticos do gênero *Biomphalaria*, seu hospedeiro intermediário. O homem é o seu principal hospedeiro definitivo, já os primatas, marsupiais, ruminantes, roedores e lagomorfos, são considerados hospedeiros permissivos ou reservatórios, e sua participação ainda não é totalmente conhecida no ciclo de transmissão da doença, apesar da capacidade de todos em eliminar ovos nas fezes (Brasil, 2010; Brasil, 2009).

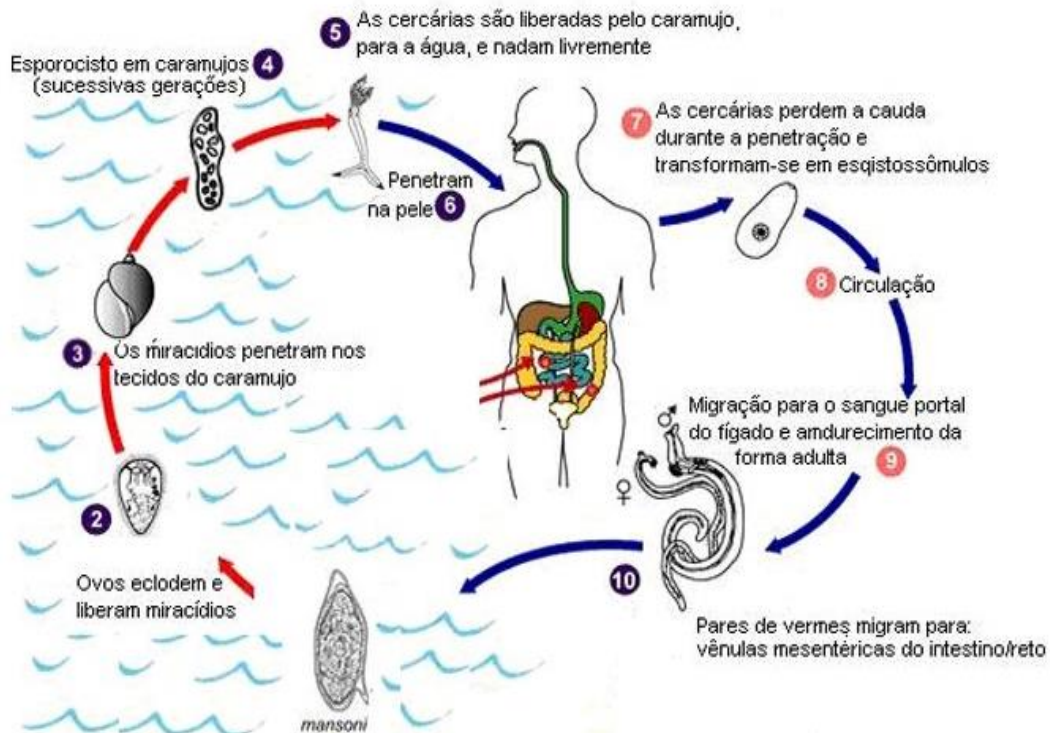
Dez espécies e uma subespécie de *Biomphalaria* ocorrem no Brasil, porém somente três são hospedeiras naturais do *Schistosoma mansoni*: a) *B. glabrata* b) *B. tenagophila* e c) *B. straminea*. (Figura 1). *B. straminea* ocorre na maioria das bacias hidrográficas no Brasil, sendo a espécie predominante no Nordeste. *B. tenagophila*, distribui-se mais restritamente ao sul da Bahia até o Rio grande do Sul (Timbó e Lima, 1999; Tibiriçá, 2008). Já o *Biomphalaria glabrata* é o mais importante hospedeiro intermediário do *S. mansoni* nas Américas, responsável pela transmissão da esquistossomose em quase todas as regiões onde ocorre a doença, altamente susceptível a *S. mansoni*, com taxas de infecção superiores a 50% (Carvalho et al., 2008c).

Figura 1: caramujos hospedeiros intermediários da esquistossomose. Fontes: <http://www.xenophora.org>.



A transmissão parasitária (Figura 2) ocorre quando fezes humanas contendo ovos de *S. mansoni* contaminam coleções hídricas (rios, córregos, lagoas e açudes). Em condições ideais de temperatura e luz os ovos eclodem e liberam os miracídios que são larvas ciliadas bastante ágeis com avançada capacidade de locomoção e afinidade quimiotática aos moluscos. Algumas horas após a penetração dos miracídios no caramujo tem início um complexo processo de alterações morfológicas originando os esporocistos primários e esporocistos secundários e por fim a cercária. Estas rompem os tecidos dos moluscos e se dispersam no ambiente aquático e, ao entrarem em contato com o hospedeiro definitivo, penetram na sua pele e/ou mucosa iniciando assim o processo infeccioso humano. Ao penetrarem a pele do hospedeiro definitivo, as cercárias evoluem para uma forma parasitária primária chamada esquistossômulo, que migra tanto através da circulação sanguínea quanto linfática, até atingir o coração e em seguida os pulmões. Ao alcançarem os vasos sanguíneos os esquistossômulos são conduzidos ao fígado, onde se desenvolvem em suas formas adultas. Nos vasos portais mesentéricos, ocorre a sobreposição da fêmea no canal ginecóforo do macho e, conseqüentemente, a cópula, seguida de oviposição (Barbosa et al., 2008; Brasil, 2005, Brasil, 2009).

Figura 2: Ciclo de transmissão parasitária da esquistossomose. Fonte: http://parasitandonaweb.xpg.uol.com.br/crbst_40.jpg.



2.1.2 Epidemiologia

Estudos realizados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) estimaram que, no ano de 2012, cerca de 249 milhões de pessoas necessitaram de tratamento preventivo e 42,1 milhões receberam tratamento para a esquistossomose. A doença causada pelo *Schistosoma mansoni* está presente em 54 países, com número maior de casos na África, Leste do Mediterrâneo e nas Américas. Na América do Sul, é encontrada na Venezuela, nas ilhas do Caribe e no Brasil (WHO, 2014).

Acredita-se que a esquistossomose ocorra de forma bastante significativa no Brasil, sendo endêmica em alguns estados do Nordeste além do norte de Minas Gerais onde ocorre a transmissão de forma mais intensa. As áreas endêmicas e focais abrangem

19 unidades federadas. A esquistossomose ocorre de forma endêmica nos estados do Maranhão, Alagoas, Bahia, Rio Grande do Norte, Pernambuco, Sergipe, Paraíba, Espírito Santo e Minas Gerais e de forma focal no Ceará, Piauí, Pará, Rio de Janeiro, Santa Catarina, São Paulo, Paraná, Rio Grande do Sul, Goiás e no Distrito Federal, não atingindo grandes áreas (Brasil, 2011).

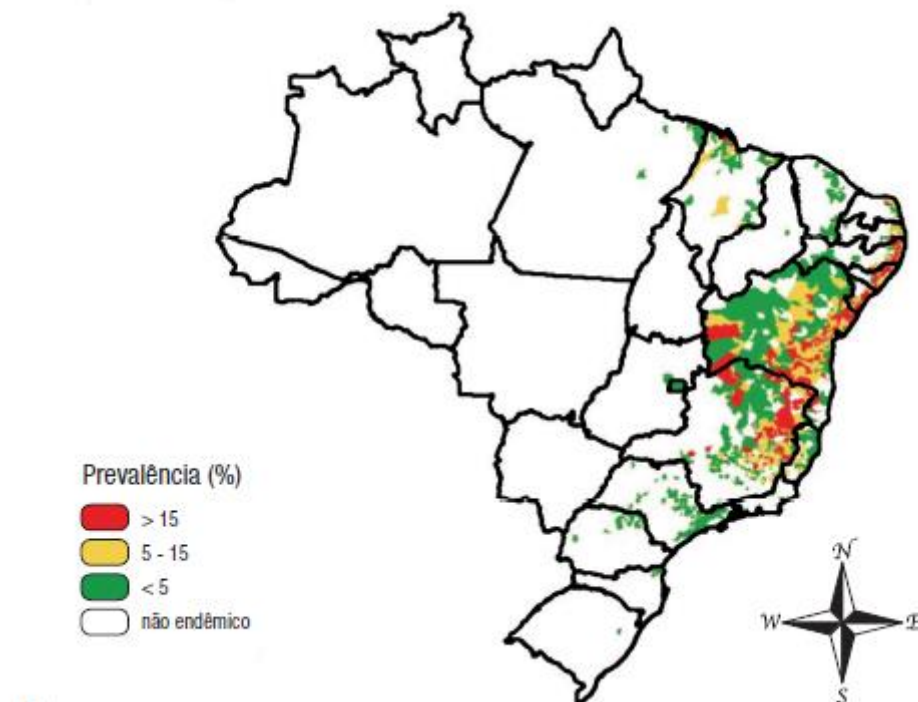
O estado de Pernambuco é considerado a unidade federada do Brasil com maior grau de endemicidade para a esquistossomose e apresenta aproximadamente 1/3 dos óbitos. Nesse estado, a esquistossomose é tradicionalmente endêmica na região rural, em localidades onde as taxas de infecção humana variam de 12% a 82%. Em 2012, foram registrados 488 óbitos pela doença no Brasil, sendo 63,3% destes na Região Nordeste. Pernambuco registrou o maior número de óbitos, 158, o que equivale a 32,4% dos óbitos por esquistossomose no País. Em 2013 este numero diminuiu para 141 óbitos, em 2014 foram realizados 256.660 exames parasitológicos de fezes em 117 municípios. Apositividade de *Schistosoma mansoni* variou de 0,1% a 22,0% nos municípios endêmicos (Brasil, 2013; Pernambuco, 2015).

É uma endemia de fácil expansão em função da associação de alguns fatores como a extensão de áreas agrícolas com projetos de irrigação, devastação ambiental, utilização das águas naturais contaminadas e ocupação das terras por uma população de baixo nível socioeconômico (Tibiriçá, 2008). Desta forma, a esquistossomose pode ser um indicativo socioeconômico importante, estando intimamente ligada à pobreza e a sua relação como questão de saúde pública é decorrente desta inter-relação (Souza e Santos, 2008).

As regiões consideradas endêmicas para esquistossomose são localidades contínuas ou adjacentes onde a transmissão da parasitose está plenamente estabelecida e para sua classificação avaliados dois critérios: prevalência, onde as localidades são distribuídas em áreas de baixa, média e alta endemicidade, com prevalência inferior a 5%, superiores a 5% e a 15% respectivamente, e características epidemiológicas locais, em que as localidades são classificadas como: sem potencial de transmissão, quando não é encontrando o hospedeiro intermediário, com potencial de transmissão quando o

hospedeiro intermediário é detectado e com transmissão quando há presença do hospedeiro intermediário e pelo menos um caso autóctone nos últimos três anos (Brasil, 2009; Brasil, 2010). A Figura 3 mostra a distribuição geográfica da esquistossomose no Brasil no ano de 2010

Figura 3: Distribuição da esquistossomose, de acordo com o percentual de positividade por município no Brasil no ano de 2010. Fonte: Brasil, 2013.



Diante destes fatos o Ministerio da saúde elaborou um plano de ações estratégicas de combate e definiu um conjunto de endemias negligenciadas e\ou relacionadas a pobreza que demandam ações estratégicas para sua eliminação como problema de saúde pública dentre elas a esquistossomose. Neste plano de ação o governo do Brasil assume um compromisso público de eliminar ou reduzir drasticamente a carga dessas doenças. Caracteriza-se principalmente pela proposição de estratégias de busca ativa de novos casos e tratamento oportuno visto que esforços dirigidos especificamente para a detecção precoce, bem como para o maior número de tratamentos realizados, impactarão na redução da circulação ambiental dos agentes etiológicos dessas endemias, e na redução do surgimento de novos casos e de suas consequências (Pernambuco, 2015).

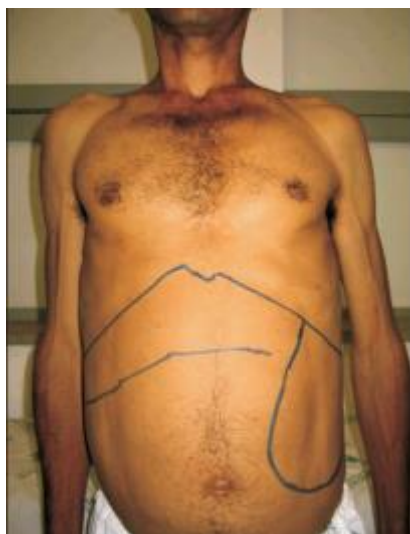
2.1.3 Sintomas

Em relação à manifestação clínica da doença, a esquistossomose pode ser classificada em duas formas evolutivas: a aguda e a crônica. A característica da fase aguda é a sintomatologia bem característica como: a dermatite cercariana, provocada pela penetração das cercárias na pele que tem sua intensidade variável desde um quadro assintomático até o surgimento de dermatite urticariforme, com erupção papular, eritema, edema e prurido, perdurando até cinco dias após a infecção, e a febre Katayama que surge geralmente de um a dois meses após a infecção, apresenta-se com febre alta, mialgias, astenia, cefaléia e tosse seca. A febre Katayama recebe este nome pois apresenta a mesma sintomatologia que a doença primeiramente identificada na cidade japonesa de Katayama e que estava relacionada com o *S. japonicum*. Os sintomas mais comuns são mal-estar, dor de cabeça, perda do apetite, suor intenso, diarreia com ou sem dor abdominal. Nos casos crônicos há dor abdominal, dificuldade de digestão e náuseas. A fase crônica acomete principalmente o aparelho digestivo, com dispepsia, surtos diarreicos (em alguns casos sanguinolentos), meteorismo, tenesmo, hepatoesplenomegalia, e por fim sinais de hipertensão portal (Pordeus et al., 2008; Carvalho et al., 2008b).

Os sintomas mais agudos surgem quando os vermes amadurecem no organismo humano, após quatro a seis semanas da infecção, mas não é raro, na sua passagem pelos pulmões, provocarem febres e problemas respiratórios. Dependendo do grau de infestação, o fígado pode aumentar muito de tamanho e o doente fica com a barriga inchada, daí a denominação de barriga d'água (Figura 4).

Em casos mais graves, devido a fibrose extensa do fígado, ocorre hipertensão da circulação portal - acumula-se sangue no baço e aparecem varizes no esôfago, órgãos cujas veias desembocam no sistema porta. A ruptura das varizes esofágicas provoca hemorragias extensas (hematêmese) e muito graves. A desnutrição dos pacientes é devida não só a anemia decorrente das hemorragias, mas também ao funcionamento insuficiente do fígado (Carvalho et al., 2008c).

Figura 4: Manifestação hepatoesplênica da esquistossomose. Fonte: Lambertucci et al., 2009



2.1.4 Formas ectópicas

Apresentações ectópicas da esquistossomose ocorrem quando os ovos do parasita ou formas adultas estão localizados longe do seu local normal (sistema portal). Esquistossomose ectópica foi reportada em diferentes localizações como: no apêndice cecal, vesícula biliar, pâncreas, peritônio, sistema urogenital, sistema nervoso central, miocárdio, pele, esôfago, estômago, tireoide e adrenal (Melo e Coelho, 2000). O ciclo de vida do *Schistosoma* é bem estabelecido. No hospedeiro definitivo, após as cercárias penetrarem a pele, migram até os vasos sanguíneos sistêmicos através dos vasos linfáticos. Nos sinusóides portais, evoluem para vermes adultos, quando então migram até os plexos venosos na região da bexiga e reto. Em áreas não endêmicas, sugere-se que os vermes podem afastar-se do seu caminho habitual, causando lesões cutâneas ectópicas (Figura 5) (Tranquilini et al, 2011). Destaca-se que manifestações através de lesões ectópicas de pele são raras em pacientes acometidos pela esquistossomose e podem ocorrer tardiamente. Geralmente, elas ocorrem mais em visitantes de áreas endêmicas do que na população residente, o que pode ser justificado pela imunidade natural, fatores raciais e genéticos (Perez, 2004; Leman et al, 2001).

Figura 5: Manifestação cutânea da esquistossomose. Fonte: Poderoso et al., 2008



Várias manifestações cutâneas estão associadas à infestação pelo *Schistosoma*. Dentre elas a dermatite cercariana que resulta da penetração das cercárias na pele intacta e ocorre logo após o contato com a água contaminada (Tranquilini et al., 2011). No entanto, as lesões cutâneas podem ser causadas pela deposição de ovos ou, raramente, de vermes adultos na pele. Esta forma de envolvimento cutâneo manifesta-se geralmente nas regiões perigenitais e genitais (Perez, 2004). Lesões infiltrativas nestas regiões provocam uma reação inflamatória e fibrótica, levando à formação de granulomas (Tranquilini, 2011).

O envolvimento do sistema nervoso central pode ser sintomático (Figura 6) ou sem sintomas (Moreno et al., 2003). A ocorrência de altas taxas de infestação, com grande envolvimento pulmonar com sintomas respiratórios geralmente é relatado (Poderoso et al., 2008). A apresentação urogenital não é incomum em áreas endêmicas (Basílio et al, 2002).

Figura 6: Mielorradiculopatia esquistossomótica. A seta aponta a bolsa de urina drenada pelo cateterismo vesical em paciente paraplégico e com retenção urinária e fecal. Fonte: Carvalho et al., 2013



A Neuroesquistossomose mansônica (NSM), refere-se à infecção por *S. mansoni* com comprometimento 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 et al., 2006), portanto a sua real prevalência é desconhecida.

O comprometimento do sistema nervoso depende da presença dos ovos ou dos vermes adultos nos parênquimas cerebral, medular ou no espaço subaracnóideo. O *Schistosoma mansoni* alcança o cérebro quando há hipertensão portal, devido ao desvio do fluxo venoso intra-abdominal para o sistema da cava superior. Na circulação pulmonar, por meio de “shunts” arteriovenosos pulmonares, o *Schistosoma mansoni* chega a circulação sistêmica sendo embolizado para diversos órgãos, entre eles o encéfalo (Matas, 2001). Nestes casos, o diagnóstico faz-se tardiamente, não raro em achados de autópsia ou quando o paciente está em fase terminal da doença.

A neuroesquistossomose é um problema de saúde pública. Até recentemente essa patologia era considerada rara. No entanto, a frequência do acometimento neurológico oscila entre 0,3% e 4% dos portadores de esquistossomose. No Brasil, existem cerca de 10% de indivíduos com esquistossomose, em torno de 17 milhões, portanto há possibilidade de existir algo em torno de 51.000 a 680.000 pessoas com neuroesquistossomose ou com grande potencial para desenvolvê-la (Santos, 2008).

2.1.5 Diagnóstico da Esquistossomose

A detecção microscópica direta de ovos de schistosoma excretados na urina e / ou fezes é um método específico, já que ovos de schistosoma são fáceis de detectar e identificar em microscopia devido o tamanho e a forma característicos com uma espinha lateral ou terminal (Wang et al., 2003). Ovos de *S. mansoni* podem ser encontrados a partir do 40º dia do contágio. Embora considerado o padrão "ouro" para a detecção de infecções por schistosoma em seres humanos, esta metodologia apresenta limitações em infecções leves, quando os ovos ficam presos no tecido ou ainda em áreas de baixa transmissão. Além disto, esta técnica diagnóstica não apresenta uma ferramenta automatizada que auxilie na contagem dos ovos de *S. mansoni*, necessitando, portanto de um profissional qualificado para sua execução (Wang et al., 2010).

Devido à sua facilidade operacional em campo e por permitir a quantificação de ovos por grama de fezes o método de Kato-Katz (Katz et al., 72) é intensamente utilizado em inquéritos coproscópicos e investigações epidemiológicas (Doenhoff et al., 2008; Zhou et al, 2009; Stothard et al, 2009; Ibrinke et al, 2011).

A detecção de anticorpos pode ser útil em determinadas circunstâncias, tais como em pacientes não ovo excretadores, mas a sua aplicação é limitada (Wang et al., 2010; Li et al., 2010). Os ensaios diagnósticos imunológicos, ou seja, baseados na detecção de anticorpos apresentam alta sensibilidade, no entanto, não conseguem distinguir infecções passadas das atuais e são relativamente susceptíveis a reações cruzadas com outros antígenos (Ross et al., 2002; Stothard et al., 2009). A maioria das técnicas se baseiam na detecção de anticorpos IgG, IgM, ou IgE contra o antígeno solúvel do verme

adulto ou do ovo por ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA), hemaglutinação indireta, ou imunofluorescência (Wang et al., 2003; Wang et al., 2010).

Ensaio baseado em reação em cadeia da polimerase (PCR) são específicos e altamente sensíveis, são utilizados na detecção de DNA de *Schistosoma* em excreções humanas, soro e plasma. A sensibilidade desta técnica é bastante satisfatória, sendo o limite de detecção de cerca de um fentograma (10-15g). (Ten Hove et al, 2008; Wichmann et al., 2009; Gomes et al., 2010; Ibironke et al., 2011; Carvalho, 2008c). Porém, a sua aplicação requer infraestrutura de alto custo, em laboratório de alta tecnologia e manuseio altamente precisos das amostras além do uso de kits e equipamentos. Sendo assim uma técnica limitada para uso em larga escala não disponível para a rotina (Carvalho et al., 2008b; Rollinson et al., 2013).

Em adição, biópsias da bexiga ou da mucosa retal aparecem como alternativa para o diagnóstico em pacientes com uma apresentação clínica típica de esquistossomose, mas sem ovos detectáveis na urina ou fezes (Wang et al., 2010). Métodos indiretos de diagnóstico desta infecção usando dados clínicos, subclínicos, ou marcadores bioquímicos não são específicos dada a apresentação generalizada da esquistossomose. A biópsia é um método de fácil execução e indolor, porém por ser uma técnica invasiva, é pouco utilizada. Na esquistossomose crônica, sem hipertensão portal, uma biópsia retal apresenta cerca de 80% de positividade enquanto que no exame de fezes, 50%. Métodos indiretos atuais incluem o uso da avaliação clínica do paciente associado com ultra-som, biópsia hepática e exame histológico subsequente e a medição de marcadores bioquímicos (Wang et al., 2003; Wang et al., 2010).

A detecção de antígenos circulantes de verme adulto ou ovos marcados com anticorpos monoclonais ou policlonais em soro, urina, ou expectoração apresenta-se como uma nova técnica promissora que pode eventualmente substituir métodos tradicionais de diagnóstico (Wang et al., 2003; Wang et al., 2010). Porém estudos demonstram que sua sensibilidade e/ou especificidade ainda não são suficientes para um diagnóstico definitivo (Li et al., 2010).

Ante o exposto faz-se necessário o desenvolvimento de um método de detecção rápidos, sensíveis e seletivos para a determinação da infecção pelo schistosoma tanto para a proteção da saúde quanto para a continuação do tratamento médico (Zhou et al., 2002a e Zhou et al., 2002b). Neste sentido a determinação eletroquímica tem se destacado devido as vantagens de baixo custo, alta sensibilidade além de ser de fácil manuseio (Buso et al., 2000; Zhu et al., 2009).

2.1.6 Tratamento

O tratamento da esquistossomose é medicamentoso, porém é sempre limitado pelo reduzido número de quimioterápicos disponíveis que exibissem eficácia, segurança e grande tolerabilidade com alta eficácia e baixa toxicidade. As drogas utilizadas são oxaminiquine, 15 mg/kg de peso para adultos e 20 mg/kg para crianças até 15 ano, que age nos vermes adultos, impedindo a oviposição e praziquantel 50 mg por quilo de peso corporal (mg/Kg) em adultos e 60 mg/kg para crianças até 15 anos, sendo administrado tanto na fase aguda como na crônica (Carvalho et al., 2008b; Brazil, 2013). No entanto, ambos apresentam limitações, como baixa eficácia no tratamento da esquistossomose mansônica aguda, baixa atividade sobre o *S. mansoni* em suas formas imaturas, bem como falha em tratamentos devido à ocorrência de resistência ou tolerância a esses fármacos (Frezza et al., 2007).

2.2 Biossensores

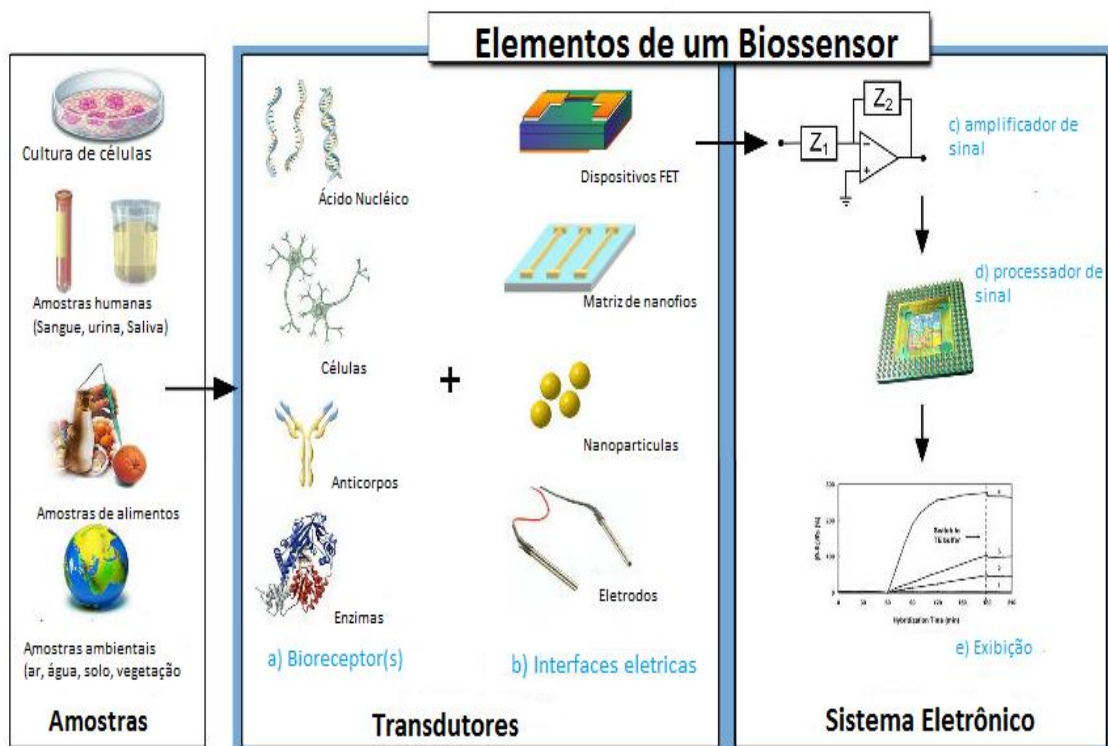
As técnicas de análises químicas e biológicas tradicionais envolvem reações que ocorrem em solução por meio de mistura dos reagentes. Um biossensor refere-se a um dispositivo em que o componente biológico está imobilizado no sistema e a reação ocorre à superfície de um eletrodo (Chaubey et al, 2002).

De modo geral, o funcionamento de um biossensor, envolve a especificidade e a alta sensibilidade do componente biológico com o substrato de interesse. Os biossensores, além de se apresentarem como promissoras ferramentas para diagnose

clínica possuem uma ampla abrangência de mercado, cobrindo as áreas militar, controle de processos, alimentícia, de bebidas e agricultura além de monitoramento ambiental rápido e contínuo. As vantagens dos biossensores não se limitam à sensibilidade e seletividade, mas também ao fato de, comumente, dispensarem um complicado pré-tratamento da amostra, o que confere praticidade, rapidez nas análises e diminuído gasto de reagentes, proporcionando assim, agilidade na obtenção dos resultados, e redução no custo financeiro (Furtado et al., 2008).

Um sensor químico pode ser definido como sendo um dispositivo que transforma informações químicas, em um sinal analiticamente útil. Estes sensores são geralmente constituídos por dois componentes básicos ligados em série: um sistema de reconhecimento químico (receptor) e um transdutor. Os biossensores são sensores químicos, em que o sistema de reconhecimento utiliza um mecanismo biológico (Trevenot et al, 2001) como representado na Figura 7.

Figura 7: Representação esquemática de um biossensor. Fonte http://www.infobibos.com/Artigos/2006_2/ITBA/figura1.jpg.



Os biossensores são dispositivos que englobam um elemento de transdução revestido por uma camada de reconhecimento bioativa. O elemento biosseletivo, conhecido como biorreceptor, é o componente responsável pela seletividade/especificidade dos biossensores, podendo ser composto por enzimas, anticorpos, DNA, ou quaisquer outras células ou organelas de seres vivos e constitui uma interface entre o analito e o eletrodo sensor. Esta interface é responsável pela regulação da especificidade e sensibilidade do dispositivo, pois é capaz de reconhecer a interação entre seus analitos específicos de forma direta ou por meio de um mediador. Da reação da interação do bioelemento com o analito resulta num produto que é seletivamente detectado e quantificado pelo dispositivo sensor. O elemento biológico poderá converter o analito noutra espécie química através de uma reação bioquímica, produzir ou libertar outro produto químico, alterar as suas propriedades ópticas, eléctricas ou mecânicas ou produzir qualquer outra resposta que possa ser quantificada. O transdutor tem a finalidade de converter a alteração físico-química no material biologicamente ativo, resultante da interação com o analito, num sinal eléctrico que pode ser adequadamente processado fornecendo um sinal de saída (Lojou et al, 2006; Chaubey et al 2002; Mello e Kubota, 2002; Campàs et al., 2008)

2.2.1 Classificação dos Biossensores

Existem diversas classificações para os biossensores. De acordo com a IUPAC (União Internacional de Química Pura e Aplicada), podemos classificá-los de acordo com material biológico específico usado para o modo de reconhecimento ou de transdução de sinal ou gerado pela combinação da mesma (Thévenot et al., 2001). No que diz respeito ao material biológico pode ser dividido em várias classes onde destacamos os biossensores enzimáticos que apresentam enzimas como elemento de biorechecimento, imunossensores que tem utilizam proteínas globulares de soro (tais como imunoglobulinas) e antígenos como biorreceptores. Quimiossensores que trata-se de um sistema que utiliza proteínas que interagem com espécies químicas, tais como hormônios, resultando em variações conformacionais. Biossensores microbiológicos que são formados por um microrganismo imobilizado, sensível e que especificamente

reconhece a espécie de interesse além dos biossensores imobilizados com ácidos nucleicos e aptâmeros (Bansi et al., 2003; Hideaki et al., 2003; Loureiro et al., 2010).

Em relação ao tipo de transdutor os biossensores podem ser classificados como eletroquímico baseado no movimento de íons e difusão de espécies eletroativas, termométrico onde se leva em conta a mudança de temperatura, piezoelétrico com a alteração de microviscosidade e/ou massa como base para análise e óptico em que a absorção ou emissão de radiação eletromagnética é o dado principal a ser analisado. Dentre estes tipos de transdutores os eletroquímicos têm se destacado (Furtado et al., 2008; Singh, 2008).

2.2.1.1 Biossensor Eletroquímico

Nos sensores eletroquímicos, a resposta é obtida na forma de um sinal elétrico, em decorrência de reações químicas envolvendo íons ou elétrons, reações estas que geram mudanças nas propriedades elétricas da solução ou da superfície do eletrodo. Estas mudanças são usadas como parâmetro de detecção. Os sensores eletroquímicos são uma importante subclasse de sensores químicos, nestes dispositivos um eletrodo é utilizado como componente transdutor, com o intuito de gerar um sinal elétrico que esteja de algum modo relacionado com a concentração do analito. Neste tipo de dispositivo um elemento bio-específico é imobilizado na superfície de um eletrodo, que vai converter o processo de reconhecimento biológico numa resposta quantificável (Chaubey e Malhotra, 2002).

As técnicas eletroquímicas fornecem limites de detecção excepcionalmente baixos e uma abundância de informações que caracterizam e descrevem eletroquimicamente determinados sistemas, sempre baseado nas propriedades elétricas de uma solução de analito em contato com uma célula eletroquímica. Tais informações incluem a estequiometria e a velocidade de transferência de carga interfacial, a velocidade de transferência de massa, a extensão de adsorção e de quimissorção e as velocidades e constantes de equilíbrio de reações químicas. Os biossensores eletroquímicos

constituem a grande maioria dos biossensores desenvolvidos. Suas principais vantagens são baixo custo, alta sensibilidade, screening rápido e estabilidade (SONG et al, 2006).

A eletroquímica é um processo interfacial que envolve a transferência (ou o impedimento desta) de um elétron de uma espécie em solução para o eletrodo ou do eletrodo para a solução. Para que a eletroquímica possa ser utilizada como ferramenta de análise é necessário que ocorra um contato entre o eletrodo e o analito possibilitando assim a transdução. Quando um eletrodo inerte é inserido em uma solução eletrolítica ele passa a ter o potencial da solução, no entanto, se este eletrodo foi mantido em outro potencial, antes de entrar em contato com a solução, será mantida então uma diferença de potencial (d.d.p.). O potencial é medido geralmente em termos relativos, sendo necessário o uso de eletrodos de referência que contêm as formas oxidadas e reduzidas de um composto, e apresentam o potencial constante. Um terceiro eletrodo, o auxiliar (ou contra eletrodo), é comumente empregado em uma célula eletroquímica. O contra eletrodo é constituído de um material inerte na faixa de potencial que se deseja trabalhar, geralmente é feito de um fio de platina. Ele tem como função principal minimizar os erros causados pela resistência da célula no controle do potencial do eletrodo de trabalho. Funcionando como fonte ou sorvedouro de elétrons. (Diamond, 1998; Bard e Faulkner, 2001a).

É necessário o uso do potenciostato para que uma das técnicas eletroquímicas seja empregada. A função deste equipamento é controlar o potencial aplicado no eletrodo de trabalho e medir a corrente que passa por ele. Dependendo do tipo de detecção estes podem ser divididos em amperométricos, potenciométricos e condutimétricos.

Detecção amperométrica

A detecção amperométrica baseia-se na mensuração da corrente resultante do processo de oxidação ou redução eletroquímica de uma espécie eletroativa. É normalmente obtida através da manutenção de um potencial constante a um eletrodo de trabalho ou numa série de eletrodos em relação a um eletrodo de referência, que também pode servir como eletrodo auxiliar, se as correntes são baixas. A corrente resultante é diretamente

proporcional com a concentração em massa da espécie eletroativa ou sua taxa de produção ou consumo (Thévelot et al., 2001). Nos métodos de detecção amperométrica é aplicado uma diferença de potencial ao eletrodo de trabalho, conseguindo-se assim que a espécie a ser determinada reaja e uma corrente seja gerada.

Usualmente o sistema fundamental de medida é formado por três eletrodos. Um eletrodo de trabalho onde vai ocorrer a reação que será analisada, um eletrodo de referência que ajusta o potencial aplicado no eletrodo de trabalho, e um contra-eletrodo que fornece a corrente também ao eletrodo de trabalho. No entanto vale ressaltar que na prática, para algumas aplicações, apenas os dois primeiros eletrodos serão suficientes. Segundo a IUPAC pode ser definida como: Método de detecção em que a corrente é proporcional à concentração da espécie geradora de corrente. A determinação amperométrica foi o ponto de interesse neste trabalho através da técnica de Voltametria Cíclica que será abordada mais adiante.

Detecção potenciométrica

Os biossensores potenciométricos estão relacionados com a detecção de um gradiente de concentração de um íon com auxílio de um eletrodo. Estes dispositivos utilizam eletrodos íon-seletivos como meio de transdução da reação biológica em um sinal elétrico. Neste tipo de biossensor, a geração de prótons H^+ altera o pH do meio e uma diferença de potencial é criada entre um eletrodo de referência e o eletrodo íon-seletivo (Kuralay 2005). Os biossensores potenciométricos geralmente fazem uso de um eletrodo de referência (inerte) e um eletrodo operante, ambos em contato com a amostra, e se baseiam no desenvolvimento de um potencial significativo no eletrodo operante por acumulação da carga e portanto, elevação da densidade de carga. Assim, enzimas consomem ou produzem espécies químicas fortemente polares ou íons oriundos da catálise, que são detectadas pelo eletrodo de íons seletivos e transformadas em um sinal mensurável.

2.2.1.2 Biossensor Óptico

Este tipo de dispositivo baseia-se na análise das mudanças das propriedades ópticas de uma solução com o intuito de monitorar a concentração de determinado analito (Bansi et al., 2003; Hideaki e Kamura, 2003). Nestes biossensores, fibras ópticas são usadas para conduzir as ondas de luz para detectores apropriados, tais como um eletrodo ou semicondutor (Mehrvar e Abdi, 2004). São baseados na medição da luz absorvida ou emitida como consequência de uma reação bioquímica. São bastante sensíveis, no entanto, não podem ser utilizados em meios turvos. Apresentam as seguintes vantagens: tamanho reduzido, alta velocidade de resposta, não sofrem interferência de ruído eletromagnético, boa biocompatibilidade e não necessitam de elementos ativos na biocamada (Bansi et al., 2003; Hideaki e Kamura, 2003).

Entre os biossensores existentes, há os biossensores ópticos baseados no princípio de ressonância de plásmons de superfície, SPR do inglês Surface Plasmon Resonance. Eles destacam-se na investigação de interações biomoleculares devido, além das características supracitadas, à alta seletividade e sensibilidade e tempo de resposta de análise da amostra em poucos minutos (Moreira et al 2010).

2.2.1.3 Biossensor Piezoelétrico

O dispositivo mais estudado e utilizado na detecção de massas é a microbalança de cristal e quartzo (QCM), designação conferida a microbalanças piezoelétricas de cristais de Quartzo. Esses tipos de biossensores contêm em seus transdutores cristais piezoelétricos com espécies imobilizadas. Estes cristais vibram quando expostos a um campo elétrico. A frequência dessa vibração varia de acordo com a espessura e do corte do cristal, sendo que cada cristal possui uma frequência de vibração característica. Esta frequência característica muda quando o cristal absorve ou desadsorve moléculas em sua superfície. Como a variação de frequência é proporcional à variação de massa do material adsorvido, tal variação pode ser determinada por circuitos eletrônicos (Vladmir et al., 2004).

A frequência de ressonância de um cristal piezoelétrico oscilante geralmente é influenciada por alterações na massa em sua superfície. Por exemplo, quando esta superfície é revestida com um antígeno, a ligação destes com seus anticorpos específicos ocasiona o consequente aumento de massa que pode ser detectada por uma alteração na frequência. Técnicas de Imunoensaio Piezoelétrico tem sido muito aplicadas em campos ambientais e relacionadas com os alimentos e laboratórios clínicos (Wang et al., 2012).

No quadro a seguir (Quadro 1) uma relação dos tipos de biossensores mais comumente utilizados. Fonte: MASCINI et al., 2001 modificado.

	Sistema de Transdução	Modo de medição	Algumas aplicações
Eletroquímico	Condutimétrico	Condutância	As reações catalisadas por enzimas
	Amperométrico	Corrente	Enzima – Substrato e os sistemas imunitários (antiígeno / anticorpo)
	Potentiométrico	Voltagem	Ions, gases, substratos enzimáticos analitos imunológicos e íons em meio biológico, eletrodos de enzimas e imuno-eletrodos
	Impedimétrico	Impedância	Imunossensores enzimáticos
Piezoelétrico	Cristais Piezoelétricos	Variação de massa	Gases voláteis, vapores e analitos imunológicos
Óptico	Fibra óptica, equipamentos de onda guiada, optoeletrônicos	Mudança de luz (luminescência, fluorescência), índice de refração.	pH, enzima substratos, analitos imunológicos

2.3 Biossensores para Schistosoma

Com o intuito de desenvolver novas metodologias diagnósticas rápidas e sensíveis para a detecção dos agentes etiológicos da esquistossomose, dentre eles o *Schistosoma japonicum*, foi elaborado um imunossensor piezoelétrico simples, sensível, e reutilizável usando membrana monocamada auto-montada de tecnologia mista (misto SAM), uma mistura de ácido mercaptopropiônico (MPA) e mercaptoetanol (ME) auto-montados na superfície de cristais de quartzo por ligações de enxofre e ouro para detecção de antígenos de *S. japonicum* diretamente do soro como alternativa para os métodos convencionais de diagnóstico bem como para imunossensores com camadas automontadas únicas. Várias amostras de soro de coelho infectadas com diferentes concentrações de anticorpos de *S. japonicum* foram analisadas utilizando ambas as técnicas de imunossensor e ELISA e, em seguida, produziu-se uma análise de correlação. Os coeficientes de correlação atingiram 0,973 (Wang et al., 2012).

O diagnóstico precoce desta enfermidade é importante, pois infecções a longo prazo podem resultar em lesões graves que podem causar o bloqueio do fluxo sanguíneo e hipertensão portal, que pode redirecionar os ovos para os pulmões e cérebro, onde eles podem ser mortais (Chou et al., 2003). Uma importante estratégia para o diagnóstico precoce de *S. japonicum* parece ser a detecção direta dos antígenos. Neste sentido Cheng (2008) buscou desenvolver um novo método diagnóstico baseado em um biossensor piezoelétrico para detecção direta de antígenos circulantes de *S. japonicum* em amostras de soro. Para isto anticorpos de imunoglobulina G (IgG) e IgM foram purificados a partir do soro de coelho imunizado. O estudo mostrou que a QCM com as sondas policlonais e a diluição direta de soro é um conceito novo e sensível na fase inicial de infecção. O método foi sensível por cerca de 500 cercarias, confirmando que este método tem potencial para detectar *S. japonicum* na fase inicial da infecção. Nie e colaboradores (2012) também visando a detecção imunológica do *S. japonicum* desenvolveram um imunoensaio eletroquímico magnético utilizando como base analítica uma plataforma de superfície hidrofóbica. Este estudo mostrou-se bastante viável apresentando sensibilidade em concentrações de anticorpos que variam de 2 ng mL⁻¹ a 15 µg mL⁻¹, com um limite de detecção de ~1.3 ng mL⁻¹. Os resultados dos

ensaios apontam para a viabilidade de aplicações práticas dos biossensores na detecção deste patógeno.

Em relação a novas metodologias diagnósticas, os imunossensores eletroquímicos têm despertado grande interesse, por trata-se de um método adequado para diagnósticos clínicos e podem ser utilizados para situações em que a capacidade de monitoramento em tempo real seja exigida (Pohanka e Skladal, 2008). O estudo realizado por Ninoska e colaboradores (2009) apresentam o desenvolvimento de um imunossensor amperométrico baseado na proteína vegetal Apirase de *Solanum tuberosum* para a determinação de anti-anticorpo de *S. mansoni*. A imobilização foi monitorada por voltamperometria cíclica em $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$, que mostrou um resposta quase-reversíveis e estáveis ao longo do tempo. Este processo também foi caracterizado por ângulo de contato e microscopia eletrônica de varredura.

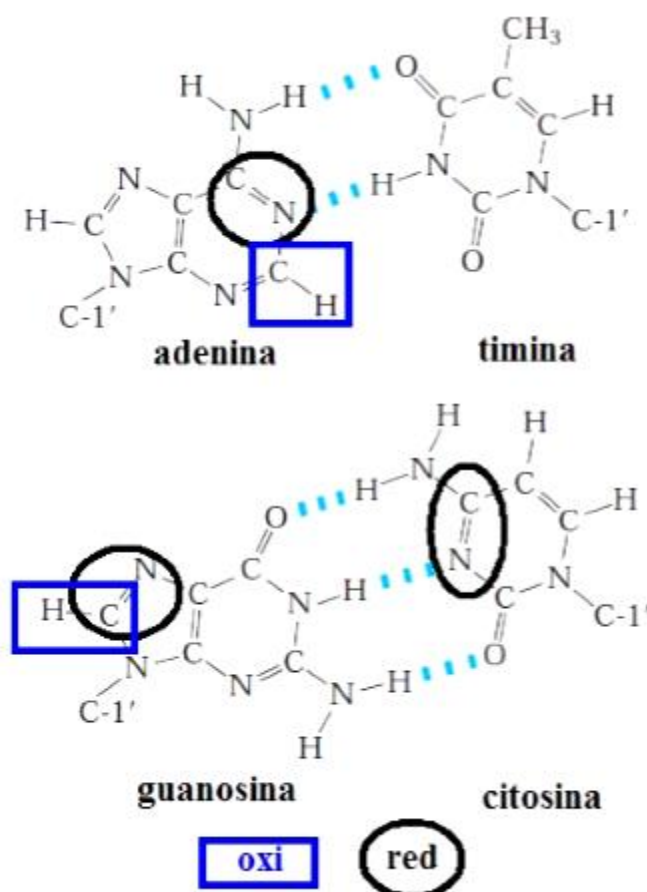
2.4 Genossensores

Técnicas de detecção de sequências de DNA têm sido amplamente desenvolvidas em inúmeras áreas. Em química analítica tradicionalmente o DNA de fita simples é utilizado como sonda de investigação, acompanhado de monitoramento do processo de hibridização, que acontece com grande especificidade e afinidade (Cunningham, 1998). Despertando um grande interesse nos estudos baseados em metodologias eletroanalíticas para determinação de sequências específicas de bases nitrogenadas pelo monitoramento do processo de hibridização (Palecek e Fojta, 2001). As vantagens são: o baixo custo, o formato simplificado de análise, a medida em tempo real, a rapidez e a seletividade (Mikkelsen, 2004; Berney et al., 2000; Pividori et al., 2000).

O comportamento eletroquímico do DNA tem sido bastante estudado. Sua eletroatividade reside em pontos estruturais da molécula, sendo basicamente relativa aos processos sofridos pelas bases nitrogenadas, mais precisamente da guanina, da adenina e da citosina, visto que estes processos ainda não estão bem descritos para a base timina, sendo a guanina a base que mais facilmente se oxida, ou seja, apresentam menores picos

de oxidação em menores regiões de potencial, e as moléculas de açúcar e de fosfato são eletroquimicamente inertes Figura 8 (Pividori et al., 2007).

Figura 8: Esquema ilustrativo do acoplamento das bases nitrogenadas que compõe o DNA. Sítios de oxidação e redução nas moléculas de guanina, citosina e adenina. Fonte: Marques, 2009



Os genossensores são dispositivos eletroanalíticos que incorporam uma camada genética imobilizada na superfície de um transdutor, como elemento de reconhecimento, convertendo informações de interação genética em sinais analíticos mensuráveis (Cunningham, 1998; Eggins, 2002). Desta forma, os genossensores eletroquímicos convertem sinais de interação entre bases nitrogenadas específicas, em sinais elétricos.

O monitoramento da formação da dupla fita de DNA, é feito pela modificação do eletrodo com DNA específico, que por sua vez, vai interagir com uma sequência de

bases complementares formando assim a dupla fita híbrida, sendo esse processo de identificação considerado bastante eficaz e específico, mesmo em presença de diferentes sequências não complementares (Fojta, 2002). O monitoramento direto deste processo é baseado nos processos redox sofrido pelas sequências específicas de DNA, principalmente da molécula de guanina. Compara-se os distintos comportamentos eletroanalíticos entre ssDNA e dsDNA, já que, o sinal obtido para a oxidação do DNA sobre o eletrodo modificado com fita simples difere do obtido pelo eletrodo após o processo de hibridização e consequentemente formação da fita dupla (Pividori et al, 2007).

Estes sensores são altamente sensíveis, de baixo, fácil manuseio, portátil e compatível com as atuais microtecnologias, principalmente pela real possibilidade de produção em massa (Palecek, 2002). Estes genossensores são atrativos para as investigações e diagnósticos genéticos, bem como detecção de espécies patogênicas, analitos de interesse clínico, espécies carcinogênicas, fármacos e sequências de bases de DNA (humano, vírus, bactéria, etc.) (Wang et al., 2006).

2.5 Nanopartículas

As nanopartículas (NPs) podem ser definidas como nanomateriais que variam em tamanho de 1- 100 nm e cujas propriedades físicas e químicas se alteram significativamente pela alteração de seu tamanho. Essas propriedades diferem das encontradas nos mesmos materiais quando em dimensões maiores (Buzea et al., 2007; Hasan, 2014). As nanopartículas são comumente empregadas na produção de biossensores, especialmente porque oferecem vantagens como a elevada área superficial, facilitam a transferência eletrônica além de facilitar a imobilização das proteínas, sendo as nanopartículas de ferro de tipo magnetita muito exploradas (Kouassi et al., 2005; Arteaga et al., 2010; Kaushik et al., 2008).

2.5.1 Aplicações de Nanopartículas em Biossensores

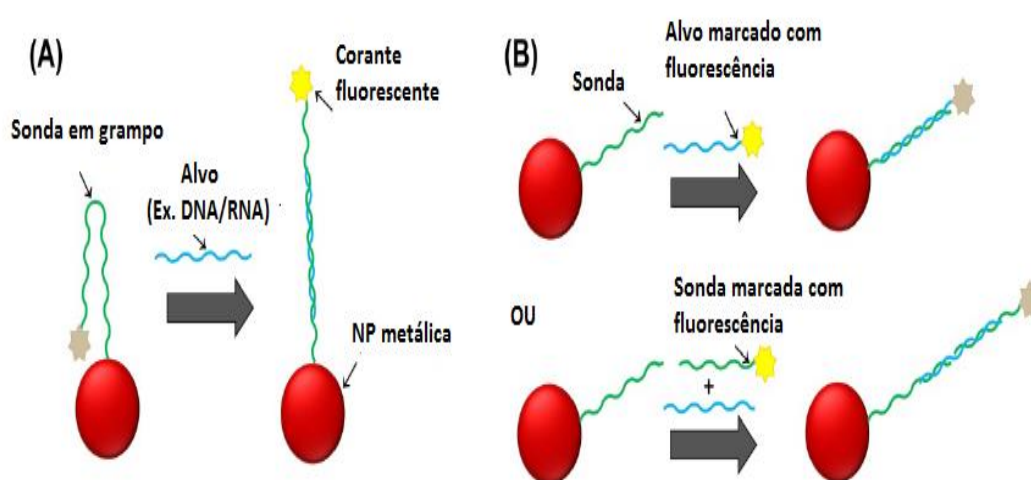
Com o aperfeiçoamento da nanomedicina surgem novas ferramentas com aplicações de nanomateriais como alternativa à medicina convencional. Desta forma, diversas aplicações de nanomateriais para diagnóstico e tratamento têm sido descritas na literatura (Blanco et al., 2011; Caruso et al., 2012; Perinotto et al., 2008). A utilização destes nanomateriais faz com que as instrumentações e metodologias tradicionais de análise sejam melhoradas (Kranz et al., 2011). Assim, o uso de métodos de diagnóstico baseadas em nanopartículas oferece uma alta sensibilidade.

As nanopartículas têm sido muito frequentemente usadas no desenvolvimento de biossensores de DNA, seja por auto-montagem de oligonucleótidos tiolados na superfície de ouro de nanopartículas (Patolski et al., 2000; Cai et al., 2002; Wang et al., 2003), ou por imobilização (por ex. em SAMs ou polímeros (Wang et al., 2003; Wang et al., 2012; Li et al., 2010). Diversas abordagens têm sido usadas para a detecção eletroquímica da hibridização de sequências de DNA com base em nanopartículas, com vantagens em termos de custo, sensibilidade e tempo de resposta. Em detecções piezoelétricas de processos de hibridização o uso de nanopartículas de ouro desempenha um papel importante na amplificação do sinal na microbalança de cristal de quartzo (Du et al., 2009). Superfícies modificadas com nanopartículas de Pt, em combinação com nanotubos de carbono, aliam as vantagens destes materiais (transferência eletrônica e atividade eletrocatalítica) e aumentam a sensibilidade do biossensor (Zhu et al., 2005).

Variados métodos de biossensoriamento altamente sensíveis para ácidos nucleicos, proteínas, anticorpos, enzimas e outras moléculas biológicas têm sido desenvolvidos, utilizando diferentes propriedades físico-químicas das nanopartículas metálicas como nanopartículas de ouro e óxido de ferro. Dentre os métodos podemos destacar: Sensor de Ressonância de Plasmon de Superfície (SPR), fluorescência, Espectroscopia Raman amplificada por superfície (SERS) e outras atividade eletroquímica.

Nesta metodologia duas abordagens são normalmente utilizadas: os modelos moleculares que dependem de NPs funcionalizadas com cadeias de DNA marcados com fluorescência, que formam uma estrutura em grampo; e NPs metálicas funcionalizadas com nanosondas que são cruzadas com cadeias de ácidos nucleicos de cadeia simples marcado com fluorescência (Figura 9)(Griffin et al., 2009).

Figura 9: Diferentes abordagens para biossensores fluorescentes à base de NPs metálicas. Adaptado de Doria et al., 2012.



O desenvolvimento de materiais com características melhoradas para aplicações bioanalíticas desperta o interesse no desenvolvimento de partículas usadas em imunoenaios (Zhou et al., 2007; Bergquist et al., 2009). Para fins diagnósticos de elevada sensibilidade e seletividade, os nanomateriais devem estar ligados a biomoléculas específicas, por exemplo, sistemas antígeno/anticorpo, enzima/substrato, receptores ou proteínas de membrana, sequências de aptâmeros, RNA ou DNA, cofatores entre outros (Wang et al., 2012).

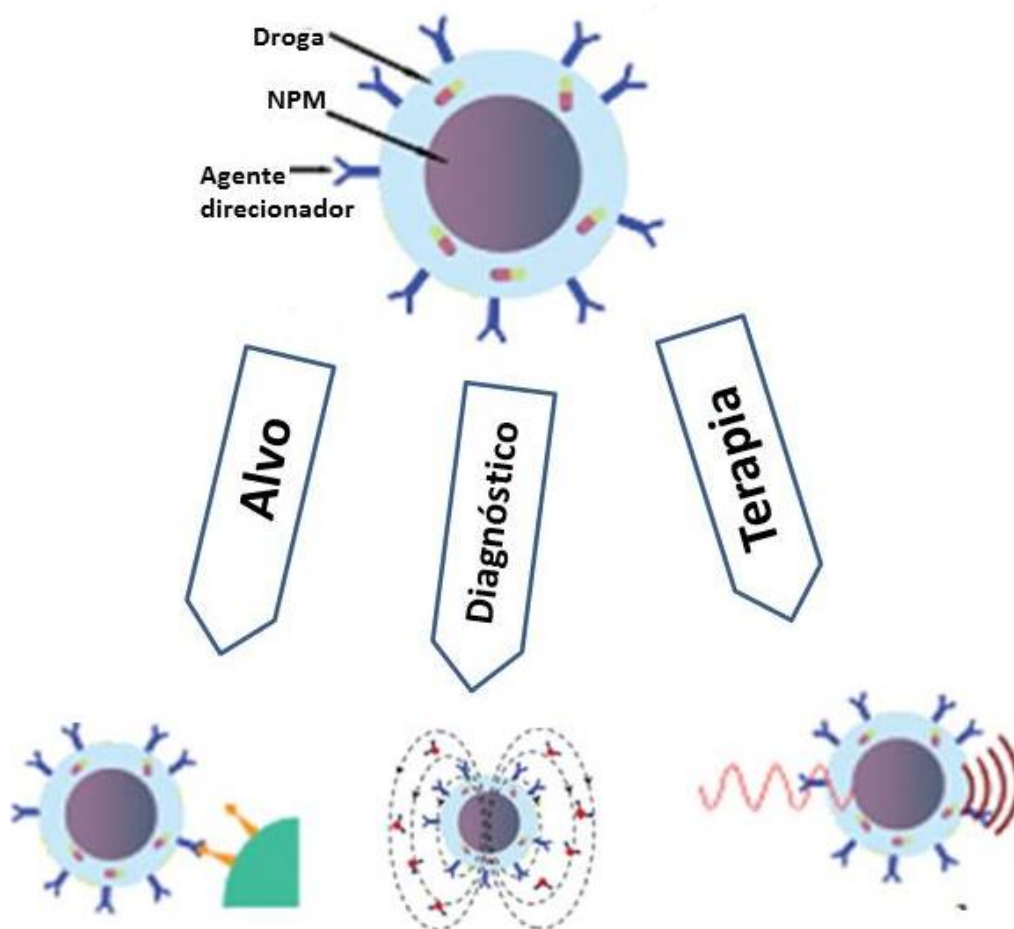
2.5.2 Nanopartículas tipo Magnetita

Dentre os diferentes tipos de sistemas nanoparticulados, destaca-se as nanopartículas de óxido de ferro, essas nanopartículas possuem características magnéticas, ou seja, podem ser manejadas pela aplicação de campos magnéticos (Corrêa, 2007). Estas estruturas podem ser compostas de diferentes átomos ou íons com variados momentos magnéticos e são comumente obtidas a partir de óxidos de ferro (Yang et al., 2006).

A magnetita é um óxido formado por íons de ferro de valências diferentes (Fe^{2+} e Fe^{3+}), sua fórmula química é Fe_3O_4 . É um composto solúvel em ácido e insolúvel em água podendo ser encontrado sob a forma cúbica ou apresentar-se como um pó preto metálico com brilho lustroso (Leal, 2006; Holland e Yamamura, 2009).

A finalidade de aplicação define o tipo de nanopartícula magnética produzida. A composição, o tamanho e a síntese das magnetitas são determinados pelo alvo de aplicação, pois este influencia em suas propriedades físico-químicas e farmacocinéticas (Hafeli e Chastellain, 2006; Vo-Dinh, 2007; Thassu et al., 2007). As nanopartículas magnéticas têm sido usadas em diferentes aplicações biomédicas, tais como: carreadoras de fármaco guiadas por campo magnético (Asmatulu et al., 2005; Tan et al., 2005), agentes de contraste para imagem por ressonância magnética (Kim et al., 2003; Lawaczeck et al., 2004; Gamarra et al., 2005; Jun et al., 2005; Cheng et al., 2005), separação biomolecular magnética e diagnósticos (Liberti et al., 2001), tratamento de tumores via hipertermia (Vo-Dinh, 2007; Thassu, 2007). A Figura 10 demonstra algumas aplicações biomédicas das nanopartículas metálicas.

Figura 10: Aplicações biomédicas das nanopartículas magnéticas. Adaptado de Umut, 2013.



As nanopartículas de ferro vêm sendo muito exploradas na elaboração de biodispositivos. Seu uso apresenta como maiores vantagens a sua baixa toxicidade, biocompatibilidade e ainda as suas propriedades magnéticas (Johnson et al., 2011; Baratella et al., 2013). Desta forma, o uso de nanopartículas de óxido de ferro modificadas tem como objetivo principal o desenvolvimento de dispositivos mais econômicos, específicos, estáveis e reprodutíveis (Arteaga et al., 2010). Neste sentido diferentes artigos (Kouassi et al., 2005; Kaushik et al., 2008; Yang et al., 2009; Baratella et al., 2013; Netto et al., 2013) mostram a utilização de nanopartículas de óxido de ferro para a preparação de biossensores.

2.5.3 Nanopartículas de Ouro

As nanopartículas têm áreas de superfície elevadas e propriedades físico-químicas únicas que podem ser facilmente ajustadas, tornando-os candidatos ideais para o desenvolvimento de sistemas de biosensoriamento (Vidotti et al., 2011). Entre os nanomateriais, o ouro tem um papel especial, nos últimos anos, tem se observado um aumento no uso de nanopartículas de ouro (AUNP) na preparação de biossensores eletroquímicos, este fato se deve às suas características únicas, como alta eletrocondutividade, superfície de energia e a razão entre superfície e volume, propriedades eletrocatalíticas, possibilidade de atuar como fios condutores elétricos entre a superfície do eléctrodo e o analito permitindo a transferência eletrônica direta (Boujakhrou, 2016).

O ouro é caracterizado pela alta condutividade térmica, baixa resistividade elétrica além de não ser facilmente afetado pelo oxigênio atmosférico na formação de óxido, também apresenta baixa toxicidade. (Loiaza et al., 2011; Salehizadeh et al., 2012). Neste sentido, o ouro proporciona a estabilidade química adequada para a funcionalização de oligonucleótidos, proteínas, biomoléculas (Qiu et al., 2010; Loiaza et al., 2011), além de ser bastante biocompatível com o corpo humano (Salehizadeh et al., 2012). Podemos destacar ainda que a superfície do ouro é de fácil funcionalização com moléculas via ligações covalentes (Lyon et al., 2004; Zhao et al., 2008).

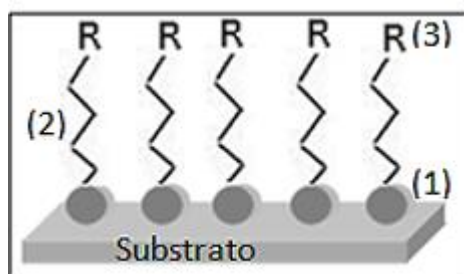
2.5.4 Modificação de superfície do transdutor

Uma metodologia bastante empregada no desenvolvimento de biossensores nanoestruturados é a modificação da superfície transdutora por meio da formação de monocamadas auto-montadas (Self Assembled-Monolayers, SAMs) (Arya et al., 2009) que propicia a ligação entre o eletrodo e as nanopartículas funcionalizadas com biomoléculas.

As monocamadas auto-montadas são altamente estáveis, sensíveis, reproduíveis e organizados (Arya et al., 2009; Morf et al., 2006). São formadas por moléculas orgânicas que podem conter grupos terminais específicos com propriedades que podem ser modificadas e facilmente manipuladas. A adsorção da molécula ocorre por conta da interação entre os grupos funcionais do adsorvente com o adsorbato, seja por forças ou interações hidrofóbicas e após a modificação, a extremidade da monocamada passa a governar as propriedades do eletrodo. A formação de SAMs envolve a ligação seletiva de moléculas numa superfície plana seguida de rearranjo periódico devido às forças intermoleculares entre espécies adjacentes, sendo que grupos específicos formam uma ligação muito estável na superfície escolhida (Freire et al., 2003; Mena et al., 2005; Campuzano et al., 2006).

As SAMs são formadas por três partes específicas: grupo cabeça/âncora, cauda e grupo funcional como mostra a Figura 11 (Schireiber, 1998):

Figura 11: Representação esquemática de uma monocamada auto-montada: (1) grupo cabeça/âncora, (2) cauda e (3) grupo funcional. Fonte: Schireiber, 2000.



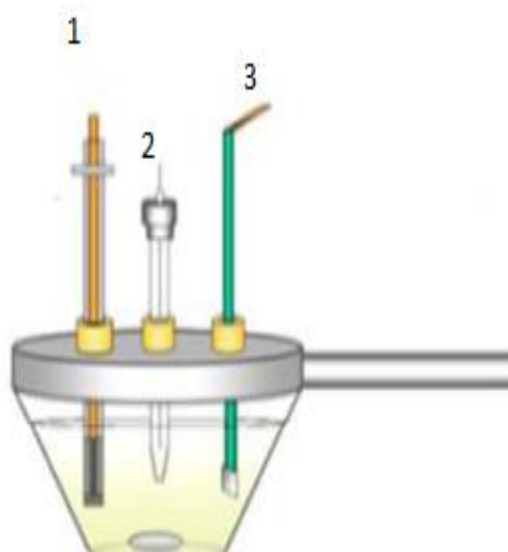
A aplicação desta técnica na construção de biossensores apresenta potencialidades no que diz respeito ao aumento da sensibilidade e da estabilidade em função da faixa de potencial trabalhada, além de fornecer um micro ambiente bastante favorável ao material biológico imobilizado, permitindo a orientação deste material na superfície da monocamada, podendo levar a uma orientação do centro de oxi-redução para com a superfície do eletrodo (Freire et al., 2003; Mena et al., 2005; Campuzano et al., 2006).

2.6 Técnicas Eletroanalíticas

2.6.1 Voltametria Cíclica

A voltametria é uma técnica eletroanalítica que fornece informações acerca da espécie eletroativa baseada nos registros de curvas de corrente em função de um potencial aplicado durante o processo eletroquímico. A análise é feita em uma célula eletroquímica constituída de um eletrodo de trabalho, sensível ao analito, um eletrodo de referência, para controle do potencial, e um eletrodo auxiliar para controle da corrente (Bard, 2011a) como esquematizado na Figura abaixo:

Figura 12: Representação esquemática de uma Célula eletroquímica com três eletrodos (1) eletrodo de trabalho; (2) eletrodo de referência e (3) eletrodo auxiliar. Adaptado de Zapp 2013.

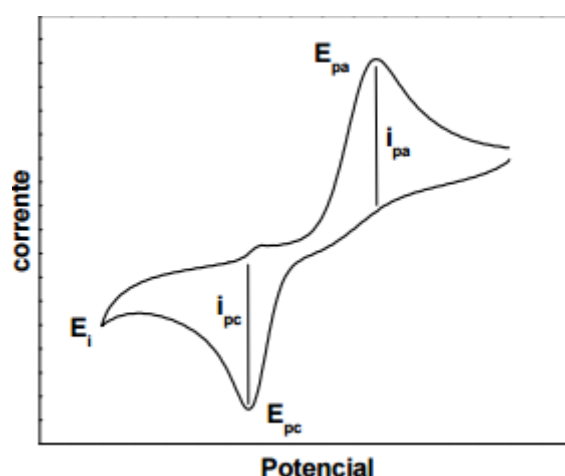


Na voltametria cíclica, o potencial elétrico aplicado no eletrodo de trabalho tem a característica de uma onda triangular, pois a princípio a varredura de potencial é feita em uma direção e, em seguida, na direção contrária, ao mesmo tempo em que a corrente é medida. Deste modo, esse programa de potenciais produz uma curva voltamétrica que

constitui um ciclo, pois o potencial é varrido no sentido direto e depois no sentido inverso, o ponto onde ocorre a reversão do potencial é chamado de potencial de inversão. Os potenciais de inversão devem ser escolhidos de maneira que se possa observar a oxidação ou redução, controlada por difusão, de uma ou mais espécies de interesse (Skoog et al., 2002; Harris, 2005).

Parâmetros importantes que são fornecidos pela curva voltamétrica nos processos de oxidação e de redução são representados por correntes de pico anódica (i_{pa}) e catódica (i_{pc}). Além destas informações relevantes obtidas através da voltametria cíclica são os potenciais de pico anódico (E_{pa}) e catódico (E_{pc}), a velocidade de varredura do potencial (v) e o potencial de inversão (E_i). A Figura 13 representa um típico voltamograma cíclico com seus principais parâmetros.

Figura 13: representação esquemática de um voltamograma cíclico típico mostrando os parâmetros obtidos por esta técnica: (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, potencial de inversão (E_i).



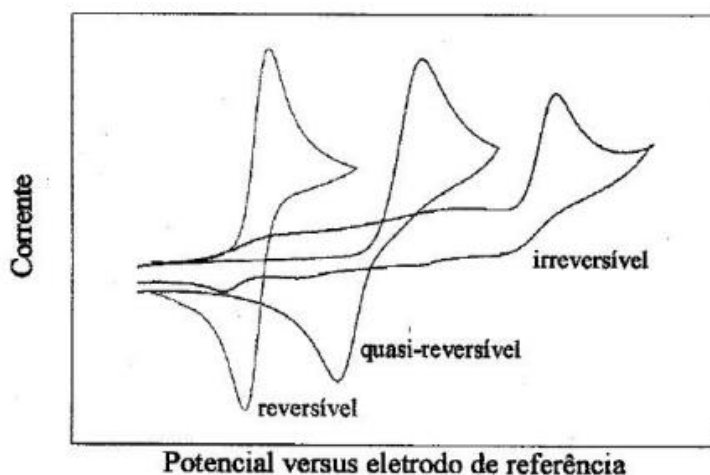
A voltametria se baseia nos fenômenos que ocorrem na interface entre a superfície do eletrodo de trabalho e a solução adjacente a essa superfície. Essa técnica é classificada como dinâmica, pois a célula eletroquímica é trabalhada na presença de corrente elétrica ($i > 0$) que, por sua vez, é medida em função da aplicação controlada de um potencial (Skoog et al., 2002). Para que um analito seja determinado por

voltametria, é necessário que ele seja eletroativo. Ou seja, deve oxidar-se ou reduzir-se em uma região de potencial aplicado na qual a transferência de elétrons seja favorecido tanto cineticamente quanto termodinamicamente, criando um fluxo de elétrons na interface eletrodo/solução, ou seja, corrente elétrica. A força motriz para este evento é o potencial aplicado no eletrodo de trabalho. Na medida em que o potencial converte-se em mais negativo (varredura catódica), a energia dos elétrons aumenta e o eletrodo se torna uma fonte de elétrons fazendo com que aja um fluxo de elétrons do eletrodo para a solução (corrente de redução). Para potenciais com características mais positivos, há uma diminuição da energia dos elétrons favorecendo a oxidação da espécie eletroativa (varredura anódica) (Bard, 2001).

A voltametria cíclica é uma ferramenta bastante utilizada para adquirir informações qualitativas sobre processos eletroquímicos. A eficiência desta técnica se deve a sua característica de rapidamente fornecer informações sobre a termodinâmica de processos redox, da cinética de reações heterogêneas de transferência de elétrons bem como sobre reações químicas acopladas a processos adsorptivos (Wang, 2000).

Esta técnica também fornece informações a respeito da reversibilidade eletroquímica de um sistema, que está relacionada à rápida troca de elétrons entre as espécies redox e o eletrodo. Nesta perspectiva, os sistemas eletroquímicos podem ser classificados em: processo reversível, irreversível ou quasi-reversível, no que se refere a reversibilidade do sistema eletroquímico como ilustrado na Figura 14 (Wang, 2000; Silva, 2010).

Figura 14: Diferentes reversibilidades de sistemas avaliados por voltametria cíclica: sistema reversível, quasireversível e irreversível (Fisher, 1996).



Em sistemas reversíveis, a velocidade de transferência de elétrons é maior que a taxa de transferência de massa. Um equilíbrio dinâmico é estabelecida na interface do eletrodo/solução devido a velocidade de reação ser suficientemente rápida para manter as concentrações de reagentes e produtos em equilíbrio. A separação dos picos catódicos e anódicos está diretamente relacionada com o número de elétrons transferido na reação reversível, e a diferença entre estes picos podem ser usada para identificar o número de elétrons envolvidos na reação eletroquímica de interesse (Wang 2006).

Nos sistemas quase irreversíveis, a corrente de pico é controlada tanto pela etapa da transferência de massa quanto pela etapa de transferência de carga. Nestes sistemas a corrente de pico cresce com a velocidade de varredura, de maneira não proporcional, e o potencial de pico é deslocado para valores mais negativos com o aumento da velocidade de varredura (Wang 2006).

Já em sistemas irreversíveis, a velocidade de transferência eletrônica é insuficiente para manter o equilíbrio na superfície do eletrodo. Quando a velocidade de transferência de carga é mais lenta que a velocidade de varredura as concentrações das espécies oxidadas e reduzidas não serão mais apenas função do potencial (Wang, 2006).

A equação de Randles-Sevcik (Equação 1) correlaciona as correntes de pico anódicas e catódicas (i_{pa} , i_{pc}) e a velocidade de varredura obtidas por voltametria cíclica em um processo reversível (SILVA, 2010).

$$i_p = (2,69 \times 10^5) n^{3/2} A C D^{1/2} v^{1/2} \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde n é o número de mols de elétrons, A é a área do eletrodo (em cm^2), C é a concentração (em mol/cm^3), D é o coeficiente de difusão (em cm^2/s), e v é a velocidade de varredura (em V/s). De acordo com a equação, a corrente é diretamente proporcional à concentração e aumenta com a raiz quadrada da velocidade de varredura (SILVA, 2010).

2.6.2 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

A Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE) é baseada aplicação de um estímulo elétrico (contínuo) fixo (uma voltagem ou corrente conhecida) ao eletrodo de trabalho, onde adicionalmente é sobreposto outro estímulo elétrico (alternado) de amplitude fixa e frequência variante com o tempo. Esta abordagem permite se observar a impedância (resposta) frente a perturbação alternada realizada num extenso intervalo de frequência. É uma técnica de caracterização elétrica, que permite estudar o comportamento geral de um sistema quando um numero grande de processos intercorrelacionados ocorre em diferentes velocidades (Silva, 2010; Carvalho et al., 2006).

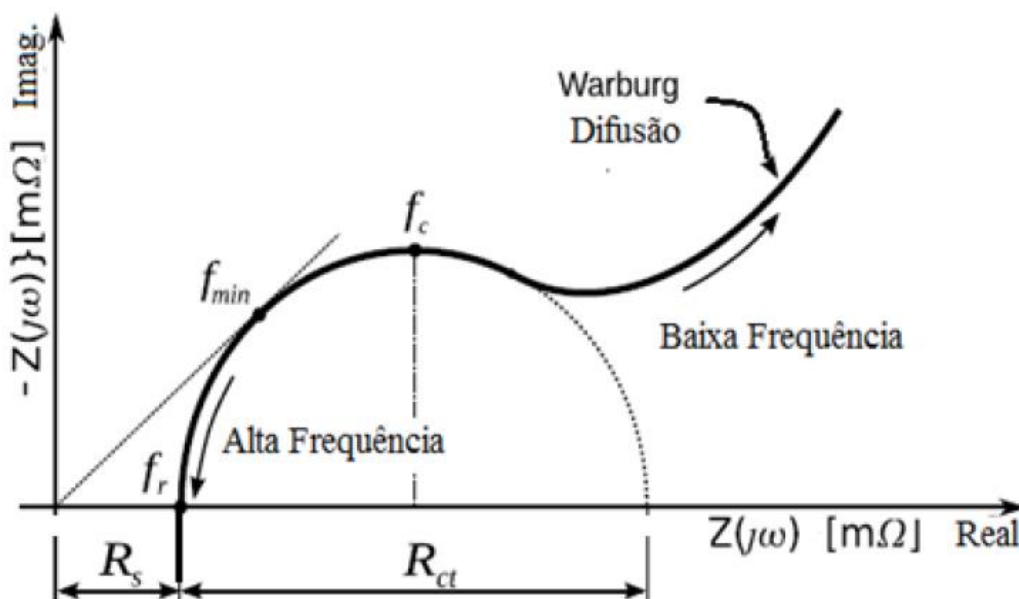
Atualmente a EIE é amplamente utilizada em diferentes linhas de pesquisa, desde o transporte eletrônico em dispositivos semicondutores até o estudo de processos cinéticos eletroquímicos das mais diferentes naturezas, ou seja, processos que ocorrem em células fotovoltaicas (Bisquer et al., 2000), baterias de íons de lítio (Bueno et al., 2003), sistemas de corrosão e/ou processos eletrocatalíticos (Alves et al., 2000), eletroquímica em estado sólido e bioeletroquímica (Fey et al., 2003; Wang et al., 2000). EIE consiste em medidas de impedância (Z) em função da frequência do sinal (f) ou

frequência angular, sobre um amplo intervalo de frequência ($\omega = 2\pi f$). A faixa de trabalho em frequência depende tanto do objetivo da análise, estudo do eletrólito ou das reações de interfaces, como da impedância do sistema (Evgenij et al., 2005; Wang 2006).

Os dados de impedância podem ser representados de diferentes maneiras, sendo as representações gráficas mais comuns o diagrama no plano complexo (Z' vs. Z''), também conhecido como diagrama de Argand-Gauss, Nyquist ou Sluyters e o diagrama de Bode ($|Z|$ e ϕ vs. $\log(\omega)$) (Silva 2013).

O aspecto geral de um diagrama de nyquist é mostrado na Figura a seguir:

Figura 15 : Diagrama de nyquist- aspecto geral da impedância eletroquímica. Fonte: Stevanatto et al., 2014.



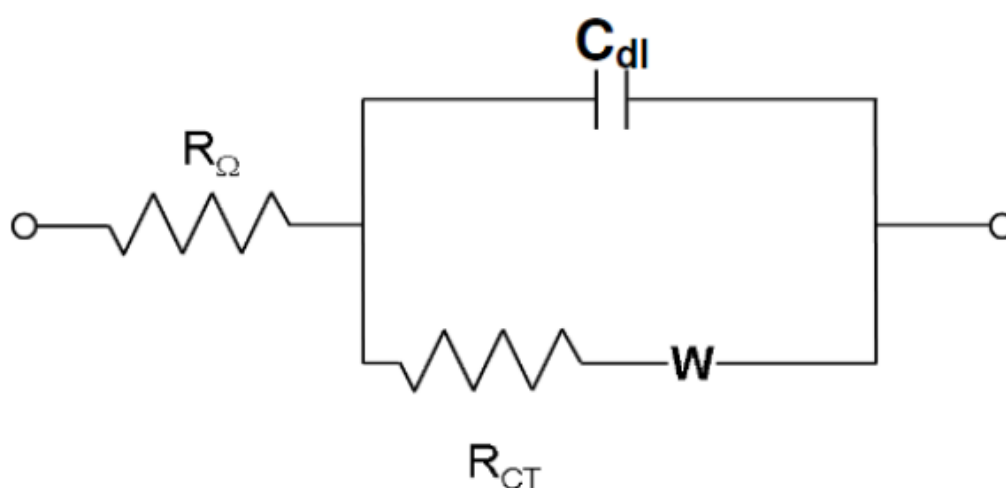
No diagrama podemos observar uma parte indutiva para frequência acima de f_r , uma resistência de alta frequência R_s , que representa a parte real da impedância para frequência acima de f_r , um primeiro e pequeno laço capacitivo do tamanho de R_{ct} , e o início do segundo e grande laço em baixas frequências que representa a frequência de

Warburg. Além disso, Dois parâmetros são obtidos da análise do semicírculo: R_{CT} que é a medida do diâmetro e a frequência de relaxação característica, f , obtida no valor máximo do semicírculo. (Stevanatto et al., 2014)

Dados de EIE podem ser analisados mediante a utilização de diferentes modelos de medida, como circuitos equivalentes ou modelos matemáticos. O uso de modelos elétricos contendo resistores, capacitores, indutores e outros componentes elétricos é uma tentativa de se mostrar que a impedância eletroquímica experimental pode se aproximar da impedância elétrica, uma vez que A aplicação de circuitos equivalentes tem como fundamento as similaridades entre o comportamento da célula eletroquímica e um circuito elétrico de resistores, capacitores e indutores (Barsoukov e Macdonalds, 2005; Damos et al., 2004).

O circuito equivalente de Randles é uma representação típica de um sistema composto por capacitores e resistores (Figura 16), e é bastante útil para a análise da impedância causada por uma reação de óxido-redução em uma interface eletrodo-solução (Pejcic, 2006).

Figura 16 : Circuito equivalente de Randles para uma interface eletrodo\solução. Fonte: Santos, 2011



Onde:

$R\Omega$ = resistência da solução eletrolítica;

ZW ou W = impedância de Warburg;

Cdl = capacitância da dupla camada elétrica;

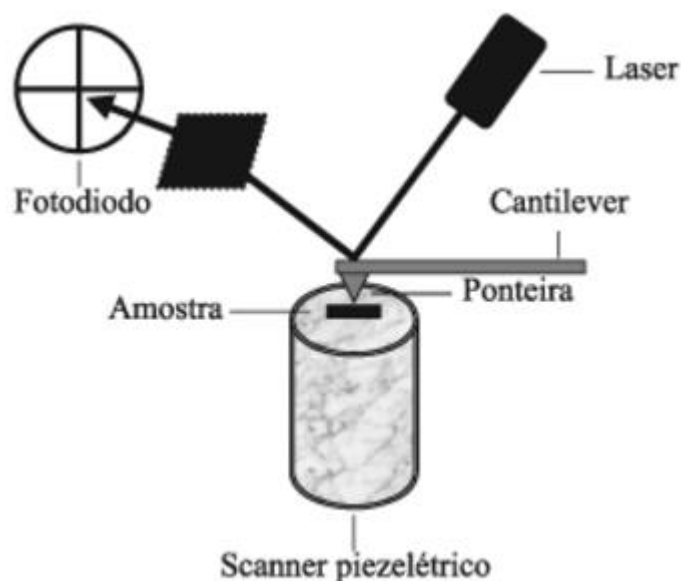
RCT = resistência de transferência de carga.

Os componentes, $R\Omega$ e ZW , representam as propriedades da solução eletrolítica e a difusão do par redox estudado, respectivamente. A capacitância da dupla camada elétrica é representada por Cdl por possuir a característica de capacitor (Grieshaber et al., 2008; Damos et al., 2004).

2.7 Microscopia de Força Atômica

O princípio de funcionamento do Microscópio de força atômica (AFM) está baseado na interação que ocorre, ao longo da varredura, entre os átomos que compõem a sua ponta e os átomos que compõem a superfície da amostra. Com a aproximação da ponta do AFM avizinhar-se a amostra (ordem de angstroms), os primeiro átomos da ponta interagem com os átomos da superfície da amostra. No decorrer da varrição, a haste sofre deflexões devidoa interação atômica, desviando o laser que incide sobre ele, o esquema de funcionamento do AFM é mostrado na figura17. O laser é detectado por um fotodiodo que envia essas informações de desvio da haste para o controle de realimentação que ajusta a posição da amostra (e/ou da ponteira) e para o computador onde é construída a topografia digitalizada da superfície da amostra (Pinto et al, 2013).

Figura 17: esquema de funcionamento do AFM. Fonte: Ferreira et al., 2006.



A técnica de AFM faz parte de uma nova classe de instrumentos pertencentes ao grupo de microscopias chamadas SPM (“Scanning Probe Microscopy – SPMs”). Recentemente, SPMs apresentam-se como ferramentas que contribuem significativamente com diversas áreas da ciência, em especial à biologia, física, ciência dos materiais e microeletrônica. Em sistemas biológicos incluindo células, bactérias, vírus e biomoléculas, isso possibilita a compreensão dos fenômenos biofísicos/químicos envolvidos, constituindo-se em mais uma ferramenta auxiliar de análise e proporcionando um rápido desenvolvimento interdisciplinar (Ferreira et al., 2006). Assim, é possível se obter novas informações sobre as bases moleculares dos processos biológicos, como por ex., a investigação de biofilmes bacterianos com superfícies metálicas em sistemas industriais, situações clínicas e adsorção de moléculas protéicas em superfícies de biomateriais.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Preparar e caracterizar filmes de Fe₃O₄_NPs/AuNPs depositados sobre eletrodo de ouro para a aplicação como sensor impedimétrico e voltamétrico para a detecção do *Schistosoma mansoni*.

3.2 Objetivos Específicos

- Determinar parâmetros físico-químicos da sonda de *Schistosoma mansoni* como elemento de biodetecção;
- Avaliar características eletroquímicas da interação da sonda de *Schistosoma mansoni* com o sistema Fe₃O₄_NPs/AuNPs;
- Estudar através de técnicas eletroanalíticas as propriedades interfaciais do sistema Fe₃O₄_NPs/AuNPs-Sondaschistosoma, bem como avaliação da bioatividade deste sistema frente a amostras do S.mansoni;
- Analisar morfológica e estruturalmente os filmes biológicos de Fe₃O₄_NPs/AuNPs-Sondaschistosoma e Fe₃O₄_NPs/AuNPs-Sondaschistosoma- genoma por microscopia eletrônica de varredura;
- Determinar a capacitância da dupla camada elétrica (Cdl) através de cálculos teóricos a partir de resultados experimentais e da resistência à transferência de carga (Zre);
- Determinar as correntes de pico anódicas (ipa) e catódicas (ipc) dos voltamogramas cíclicos.

4. METODOLOGIA

4.1 Materiais

Amostras de *Schistosoma* foram fornecidas pelo Laboratório de Parasitologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (Recife, Brasil). Todas as amostras foram previamente caracterizadas utilizando RT-qPCR.

Ácido Marcaptobenzoico (AMB), Ouro (III), cloreto hidratado ($\text{HAuCl}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$), (3-aminopropil) trietoxissilano (APTES), Citrato trissódico, albumina de soro bovino (BSA), 1-[3-(dimetilamino) propil] -3-etilcarbodiimida (EDC) e N-hidroxissuccinimida (NHS) foram adquiridos da Sigma Chemical (St. Louis, MO, EUA). Hidróxido de amônio (NH_4OH), ferro e ferricianeto de potássio foram obtidos a partir de VETEC (Brasil). Todos outros produtos químicos utilizados neste trabalho foram de qualidade de grau de reagente, adquirido a partir de Sigma-Aldrich, e utilizados tal como recebidos sem purificação adicional. A água foi purificada com um sistema de purificação Millipore Milli-Q.

4.2 Preparações das amostras

As amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR) (1 ml) de todos os pacientes e controles foram recolhidos por punção lombar. A análise do LCR consistiu de contagem geral e específica de célula, glicose, proteína, eletroforese de proteínas e determinações imunológicas para esquistossomose (ELISA), herpes, sífilis, cisticercose, toxoplasmose, citomegalovírus, vírus Epstein-Barr, vírus da imunodeficiência humana, varicela zoster, *Cryptococcus* e o vírus linfotrópico humano. Estas amostras foram também analisadas de acordo com o Brusky (2016) usando NPCR, no Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães na FIOCRUZ, estado de Pernambuco.

O DNA do *Schistosoma* foi purificado usando o illustra tissue & cells genomic Prep Mini Spin Kit (GE Healthcare, UK) de acordo com as instruções do fabricante. O

DNA em amostras de líquido de pacientes foi extraída e purificada usando o illustra blood genomicPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare, UK) de acordo com as instruções do fabricante. Assim, foi quantificado num espectrofotómetro e armazenado a -20°C. O primer tiolado utilizado foi Schfo17 (5'-GTGCTGGT GGGTTGACGAGTTC-3'). Este primer é específico para *S. mansoni* (Abath, 2002).

4.3 Síntese de nanopartículas

As nanopartículas de ouro foram sintetizadas utilizando o método de Frens (1973). Inicialmente, 100 mL de $\text{HAuCl}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ 0,01% foi fervida sob agitação vigorosa em um balão de fundo redondo. 2,5 mL de citrato trissódico (1% p/p) de solução foi adicionado rapidamente à solução em ebulição, o que resulta numa mudança de cor de amarelo pálido a vermelho escuro, indicando a formação de AuNPs. A solução foi mantida à temperatura de ebulição durante 10 minutos.

As nanopartículas de óxido de ferro modificadas com APTES foram obtidas de acordo com Gan et al (2011). Inicialmente, 0,2 g de Fe_3O_4 _NPs foram adicionados a 90 mL de etanol, posteriormente, 2 mL de hidróxido de amónio (25%) e 300 µL APTES foram adicionados à solução anterior. A mistura de reação foi agitada durante a noite. O sistema foi separado por um ímã e lavado três vezes com água desionizada para obtenção do $\text{NH}_3\text{-Fe}_3\text{O}_4$ _NPs.

4.4 Modificação do eletrodo

O eletrodo de ouro foi polido em uma lixa com água desionizada, posteriormente o eletrodo foi imerso numa solução piranha durante 5 minutos, seco à temperatura ambiente e incubado com 2 µL AMB após a lavagem com água desionizada. Subsequentemente, foi adicionado 2 µL de EDC 0,4 M e NHS 0,1 M em uma proporção de 1: 1 sobre a superfície do eletrodo, a fim de ativar os grupos carboxílicos presentes nas moléculas do AMB, por um período de 10 min. Depois disso, 2 µL de $\text{NH}_3\text{-Fe}_3\text{O}_4$ _NPs foi lançada sobre o eletrodo modificado com AMB-EDC/ NHS- e incubado por 10 min. Em seguida, os grupos amina protonadas residuais de MBA-

Fe₃O₄_NPs foi modificado com AuNPs obter (MBA-Fe₃O₄_NPs-AuNPs) utilizando o mesmo método de EDC / NHS. Finalmente, a sonda de DNA tiolada foi imobilizada na superfície do AuNPs. BSA foi utilizado em todas as experiências para evitar interações não específicas. Em seguida, os grupos de amins residuais de AMB-Fe₃O₄_NPs foram modificado com AuNPs por auto-montagem para se obter (AMB-Fe₃O₄_NPs-AuNPs) para permitir a imobilização da sonda de DNA-Schistosoma tiolado (SondaDNAShistososma) durante 20 minutos.

4.5 Análise de hibridização

O DNA alvo foi diluído em solução tampão PBS 10 mM. Subsequentemente, aqueceu-se durante 3 min a 40 ° C antes dos experimentos. A hibridação foi realizada por técnica de revestimento usando 2μL do DNA alvo obtido a partir de soro humano e LCR em diferentes concentrações.

4.6 Medidas Eletroquímicas

As análises eletroquímicas foram realizadas num PGSTAT 128N potenciostato / galvanostato (Autolab, Holanda) em uma célula eletroquímica de três eletrodos na presença de uma solução de 10 mM de K₄ [Fe (CN) ₆]⁴⁻ / K₃ [Fe (CN) ₆]³ (1: 1) usado como uma sonda redox. A superfície do eletrodo de ouro foi usada como eletrodo de trabalho. Eletrodo de fio de platina e eletrodo de Ag / AgCl (solução saturada de KCl) foram usados como eletrodos auxiliares e de referência, respectivamente. Os experimentos de EIE foram realizados a uma frequência entre 100 MHz e 100 kHz, com uma faixa de potencial de 10 mV aplicado. Análise de CV foram realizados em uma faixa de potenciais entre 0,7 V e -0.2V a uma velocidade de varredura de 50mVs⁻¹. Todas as medições electroquímicas foram realizadas em triplicado utilizando três amostras diferentes (n = 3).

4.7 Medições de Microscopia de Força Atômica

Análises estrutural do sistema foram realizadas utilizando um microscópio de força atômica (SPM-9700, Shimadzu Corporation, Japão) em um modo sem contacto em ar à temperatura ambiente (aproximadamente 25 ° C). Cantilevers do AFM com uma ponta de silicone (nanoworld, Japão, a frequência ressonante = 300 kHz, constante de elasticidade = 42 N.m-1) foram usadas. As imagens (512 pontos por linha) foram coletadas com uma taxa de varrimento de 1,0 Hz em uma área de digitalização de 7,0 × 7,0 mm. Para eliminar artefatos, as imagens foram obtidas a partir de pelo menos duas áreas separadas macroscopicamente em cada amostra e analisadas utilizando o software AFM Gwyddion.

5. CONCLUSÃO

Neste estudo as técnicas de impedância eletroquímica e voltametria cíclica foram utilizadas na fabricação de um novo biossensor específico para o *S.mansoni*. O biossensor desenvolvido mostrou um bom desempenho para determinação da sequência alvo genômico de *S. mansoni* com baixo limite de detecção, especificidade e reprodutibilidade. Todas as medições electroquímicas foram realizadas em triplicado utilizando três amostras diferentes ($n = 3$). A plataforma sensora desenvolvida foi eficaz na detecção de *S. mansoni* em diferentes fluidos biológicos. Estes resultados confirmaram que esta abordagem de detecção fornece uma maneira rápida, sensível e conveniente para a detecção de *S. mansoni*. O genossensor aqui exposto apresenta-se como uma ferramenta promissora para o diagnóstico eficiente da esquistossomose em suas diferentes manifestações clínicas.

6. PERSPECTIVAS

No presente estudo descreveu-se novas ferramentas necessárias para o desenvolvimento de biossensores impedimétricos para ácidos nucleicos e também informações físico-químicas sobre o reconhecimento do genoma de *S. mansoni* na superfície sensora. O método revelou ser bastante simples seletivo e sensível ao analito. Esse estudo serve de base para o desenvolvimento de novos sensores para Esquistossomose em suas diferentes manifestações clínicas baseado na imobilização de nanocompósito de óxido de ferro e ouro. Estudos posteriores poderão ser efetuados no sentido de se obter limites de detecção mais baixos a partir de outras superfícies sensoras, aperfeiçoamento da plataforma, bem como novas análises mais aprofundadas utilizando microscopia de força atômica e microscopia de transmissão.

REFERÊNCIAS

- ABATH, F.G.; MELO, F.L.; WERKHAUSER, R.P.; MONTENEGRO, L.; MONTENEGRO, R.; SCHINDLER, H.C. Single-tube nested PCR using immobilized internal primers., **Biotechniques**, 33 (2002).
- ALFAYA, A.A.S.; KUBOTA, L.T.A. Utilização de materiais pelo processo de sol-gel na construção de biossensores. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 835-841, 2008.
- ALVES, V.A.; SILVA, L.A.; BOODTS, J.F.C. Impedance study of the oxygen evolution on the IrO₂/TiO₂/CeO₂ system in acidic medium. Polish **Journal of Chemistry**, 74, 3, 421-428, 2000.
- ARYA, S. K.; SOLANKI, P. R.; DATTA, M.; MALHOTRA, B.D. Recent advances in self-assembled monolayers based biomolecular electronic devices **Biosensors and Bioelectronics** 2009, 24, 2810–2817
- ARTEAGA, K. A.; RODRIGUEZ, J. A.; BARRADO, E. Magnetic solids in analytical chemistry: a review. **Analytica Chimica Acta** 2010, 674, 157–165
- ASMATULU, R.; ZALICH, M.A.; CLAUS, R.O.; RIFFLE, J.S. Synthesis, characterization and targeting of biodegradable magnetic nanocomposite particles by external magnetic fields. **J. Magn. Magn. Mater.** 292 (2005) 108–119.
- BANSI D MALHOTRA E ANTHONY P F TURNER. Advances in Biosensors, **Elsevier Science**, vol. 5, 2003.
- BARATELLA, D.; MAGRO, M.; SINIGAGLIA, G., ZBORIL, R.; SALVIULO, G., VIANELLO, F. A glucose biosensor based on surface active maghemite nanoparticles **Biosensors and Bioelectronics** 2013, 45, 13–18 49

BARBOSA, C.S; FAVRE, T.C; AMARAL, R.S; PIERI, O.S. Epidemiologia e controle da esquistossomose mansoni. In: CARVALHO, O.S; COELHO; P.M.Z; LENZI, H.L. *Schistosoma mansoni* e Esquistossomose: uma visão multidisciplinar. 20 ed., cap. 31, Rio de Janeiro: **FIOCRUZ**, 2008.

BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **ELECTROCHEMICAL METHODS Fundamentals and Applications**, John Wiley, New York. second edition, 2001a.

BARD, A. J.; MIRKIN, M. V. **Scanning Electrochemical Microscopy**, Marcel Dekker, New York, USA, 2001b.

BARSOUKOV & MACDONALD, **Impedance Spectroscopy**, 2nd ed., Wiley & Sons, New Jersey, 2005.

BASÍLIO-DE-OLIVEIRA, C. A.; AQUINO, A.; SIMON, E. F.; EYER-SILVA, W. A. Concomitant prostatic schistosomiasis and adenocarcinoma: case report and review. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases** 6:45-49, 2002

BERGQUIST R, JOHANSEN MV, UTZINGER J Diagnostic dilemmas in helminthology: what tools to use and when? **Trends Parasitol** 25: (2009) 151–156

BERNEY, H.; WEST, J.; HAEFELE, E.; ALDERMAN, J.; LANE, W.; COLLINS, J. K. A DNA diagnostic biosensor: development, characterization and performance. **Sensors and Actuators B**, v. 68, n. 1-3, p. 100-108, Aug. 2000

BISQUER, J.; BELMONTE, G.,G.; SANTIAGO, F.,F.; FERRIOLS, N.,S.; BOGDANOFF, P.; PEREIRA, E.,C.; Doubling exponent models for the analysis of porous film electrodes by impedance. Relaxation of TiO₂ nanoporous in aqueous solution. **Journal of Physical Chemistry B**, 104:10 2287. 2000 50

BLANCO, E.; HSIAO, A.; MANN, A. P.; LANDRY, M. G.; MERIC-BERNSTAM, F.; FERRARI, M. Nanomedicine in cancer therapy: innovative trends and prospects. **Cancer Science** 2011,102,1247.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica**/Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica 6o ed., Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica**/Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica 7o ed., Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Situação epidemiológica da esquistossomose no Brasil. Grupo técnico das parasitárias.** Brasília: Editora do Ministério da saúde, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Sistema de Informação do Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose –SIPCE**, 2011a. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinan/pce/cnv/pce.def>>.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância em Doenças Transmissíveis. **Plano integrado de ações estratégicas de eliminação da hanseníase, filariose, esquistossomose e oncocercose como problema de saúde pública, tracoma como causa de cegueira e controle das geohelmintíases : plano de ação 2011-2015** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância em Doenças Transmissíveis. – 1. ed., 1. reimpr. - Brasília : Ministério da Saúde, 2013.^

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Vigilância da Esquistossomose Mansoní : diretrizes técnicas** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de

Vigilância das Doenças Transmissíveis. – 4. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 2014.
144 p. : il.

BRUSCKY, I.S.; MELO, F.L.; MEDEIROS, Z.M.; ALBUQUERQUE, F.F.;
WANDERLEY, L.B.; CUNHA-CORREIA, C. Nested polymerase chain reaction in
cerebrospinal fluid for diagnosing spinal cord schistosomiasis: A promising method, **J
Neurol Sci**, 366 (2016) 87-90.

BONANNI A, DEL VALLE M. Use of nanomaterials for impedimetric DNA sensors:
A review. **Anal Chim Acta** [Internet]. Elsevier B.V.; 2010;678(1):7–17. Available
from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2010.08.022>

BOUJAKHROUT, A.; DÍEZ, P.; SÁNCHEZ, A.; MARTÍNEZ-RUIZ, P.;
PINGARRÓN, J.M.; VILLALONGA, R. Gold nanoparticles-decorated silver-
bipyridine nanobelts for the construction of mediatorless hydrogen peroxide biosensor,
Journal of Colloid and Interface Science (2016)

BUENO, P.R.; LEITE.E. R.; GIRALDI, T.R.; BULHOES, L.O.S.; LONGO, E.
Nanostructured Li íon insertion electrodes. 2. Tin dioxide nanocrystalline layers and
discussion on “nanoscale effect”.**Journal of Physical Chemistry B**, 107, 8878-8883,
2003.

BUSO, A.; BALBO, L.; GIOMO, M.; FARNIA, G.; SANDONÀ, G. Electrochemical
removal of tannins from aqueous solutions. **Ind. Eng. Chem. Res.**, 39 (2000), p. 494

BUZEA, C.; PACHECO, I. I.; ROBBIE, K. Nanomaterials and nanoparticles: Sources
and toxicity. **Biointerphases**, 2, 2007.

CAI, H.; WANG, Y.; HE, P.; FANG, Y. Electrochemical detection of DNA
hybridization based on silver-enhanced gold nanoparticle label. **Anal. Chim. Acta** 469
(2002) 165

CAMPÀS, M.; CARPENTIER, R.; ROUILLON, R. Plant tissue-and photosynthesis-based biosensors. **Biotechnol. Adv.**, 26, 370–378, 2008. 52

CAMPUZANO, S.; PEDRERO, M.; MONTEMAYOR, C. Characterization of alkanethiol-self-assembled monolayers-modified gold electrodes by electrochemical impedance spectroscopy. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 586, n. 1, p. 112-12, Jan. 2006

CARUSO, F.; HYEON, T.; ROTELLO, V. M. Nanomedicine. **Chem. Soc. Rev.** 2012,41,2537-8.

CARVALHO, R. B.; SOBRAL, H. A. C.; LOPES, J. M.; TODINOV, L. R.; FORMIGA, G. J. S. Granuloma Esquistossomótico Gigante do Cólon com Intussuscepção: Relato de Caso. **Rev bras Coloproct**, 2008a; 28(3): 347-349.

CARVALHO, O.S.; JANNOTTI-PASSOS, L. K.; CALDEIRA, R. L. Importância epidemiológica e biologia molecular aplicada aos estudos dos moluscos do gênero *Biomphalaria*. In: Carvalho, O.S; Coelho; P.M.Z; Lenzi, H.L. *Schistosoma mansoni* e Esquistossomose: uma visão multidisciplinar. 20 ed., cap. 9, Rio de Janeiro: **FIOCRUZ**, 2008b.

CARVALHO, O.S; AMARAL, R.S; DUTRA, LV; SCHOLTE R.G.C; GUERRA M.A.M.. Distribuição espacial de *Biomphalaria glabrata*, *B.straminea* e *B.tenagophila*, hospedeiros intermediários de *Schistosoma mansoni* no Brasil. In: Carvalho, O.S; Coelho; P.M.Z; Lenzi, H.L. *Schistosoma mansoni* e Esquistossomose: uma visão multidisciplinar. 20 ed., cap, 11. Rio de Janeiro: **FIOCRUZ**, 2008c

CHAUBEY, A.; MALHOTRA, B.D.; Mediated Biosensors. **Biosensors and Bioelectronics** 17, 2002.. 441-456

CHEN, A.W.Y., ALAM, M.H., WILLIAMSON, J.M.L., BRAWN, L.A.,. An unusually late presentation of neuroschistosomiasis. **J. Infect.** 53, 2006155–158.

CHENG, F.Y.; SU, C.H.; YANG, Y.S.; YEH, C.S.; TSAI, C.Y.; WU, C.L. WU; Characterization of aqueous dispersions of Fe₃O₄ nanoparticles and their biomedical applications. **Biomaterials** 26 (2005) 729–738. 53

CHENG, C. W.; CHEN, C. K.; CHEN, Y. S.; CHEN, L. Y.. Determination of Schistosoma japonicum circulating antigens in dilution serum by piezoelectric immunosensor and S/N enhancemen. **Biosensors and Bioelectronics** 24 (2008) 136–140

CHOU, Y., CHIOU, H., TIU, C., CHIOU, S., LEE, S., HUNG, G.,WU, S., KUO, B., LEE, R., CHIANG, J., CHANG, T., YU, C.,. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 68, 182003–23.

CORRÊA, F.A.P. Avaliação da biocompatibilidade de fluído magnético à base de nanopartículas de maghemita recobertas por polifosfato em camundongos. **Dissertação** (Pós-Graduação em Patologia Molecular). Universidade de Brasília, 2007

COURA, J. R.; AMARAL, R. S. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazilian endemic areas. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 2004; 99:13-19

CUNNINGHAM, A. J. **Introduction to bioanalytical sensors**. New York: Wiley, 1998

DAMOS, F. S.; MENDES, R. K.; KUBOTA, L. T.; Aplicações de QCM, EIS e SPR na investigação de superfícies e interfaces para o desenvolvimento de biossensores, **Quim. Nova**, Vol. 27, No. 6, 970-979, 2004.

DAVIS, A. Schistosomiasis. In: Cook, G.C., Zumla, A.I. (Eds.), Manson's Tropical Diseases. **Saunders Elsevier**, 2009. pp. 1425–1460

DIAMOND, D. **Principles of chemical and biological sensors**. John Wiley e sons. Inc. 1998. New York , USA. p. 3- 166.

DOENHOFF, M. J., CIOLI, D., UTZINGER, J. Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. **Curr Opin Infect Dis**. 2008;21:659–67. 54

DU, P.; LI, H.; MEI, Z.; LIU, S. Electrochemical DNA biosensor for the detection of DNA hybridization with the amplification of Au nanoparticles and CdS nanoparticles. **Bioelectrochemistry** 75 (2009) 37

EGGINS, B. R. **Chemical sensors and biosensors**. New York: Wiley, 2002.

EVGENIJ BARSOUKOV, J. ROSS MACDONALD; **Impedance Spectroscopy: Theory, Experiment, and Applications**, New Jersey; Wiley-Interscience, 2005.

FERREIRA, A. A. P.; YAMANAKA, H. Atomic force microscopy applied to immunoassays. **Quím. Nova** vol.29 no.1. 2006

FEY, G.T.K.; WENG, Z.X.; CHEN, J.G.; KUMAR, T.P.; Mater. **Chem. Phys.** 2003, 80, 309.

FISHER, A. C. Electrode Dynamics. **Oxford Chemistry Primers**, p. 96, 1996.

FOJTA, M. Electrochemical sensors for DNA interactions and damage. Review. **Electroanalysis**, v. 14, n. 21, p.1494-1500, Nov. 2002.

FREIRE, R. S.; PESSOA, C. A.; KUBOTA, L.T. Emprego de monocamadas autoorganizadas no desenvolvimento de sensores eletroquímicos. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 381-389, 2003.

FRENS, G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions, **Nature Phys. Sci**, 241 (1973) 20-22.

FREZZA, T.F., MADI, R.R., BANIN, T.M., PINTO, M.C., SOUZA, A.L.R., GREMIÃO, M.P.D., ALLEGRETTI, S.M. Efeito do praziquantel incorporado a lipossomas nos diferentes estágios de desenvolvimento dos ovos de *Schistosoma mansoni*. **Rev Ciênc Farm Básica Apl**. 2007;28 (2):209-14. 55

FURTADO, R. F., DUTRA, R. A. F., ALVES, C. R.; PIMENTA, M. G. R.; GUEDES. M. I. F. Aplicações de biossensores na análise da qualidade de alimentos. **Embrapa agroindústria tropical**. 2008.

GAN, N.; JIN, H.; LI, T. ; ZHENG, L. Fe(3)O(4)/Au magnetic nanoparticle amplification strategies for ultrasensitive electrochemical immunoassay of alfa-fetoprotein, **Int J Nanomedicine**, 6 (2011) 3259-3269.

GAMARRA, L.F.; BRITO, G.E.S.; PONTUSCHKA, W.M.; AMARO, E.; PARMA, A.H.C.; GOYA, G.F. Biocompatible superparamagnetic iron oxide nanoparticles used for contrast agents: a structural and magnetic study. **J. Magn. Magn. Mater**. 289 (2005), 439–441

GOMES, L.I., DOS SANTOS MARQUES, L.H., ENK, M.J., DE OLIVEIRA, M.C., COELHO, P.M., RABELLO, A., Development and evaluation of a sensitive PCR-ELISA system for detection of *Schistosoma* infection in feces. **PLoS Negl. Trop. Dis**. 4, 2010e664.

GRAY, D.J.; MCMANUS, D. P.; LI, Y. S.; WILLIAMS, G. M.; BERGQUIST, R.; ROSS, A. G. Schistosomiasis elimination: lessons from the past guide the future. **Lancet Infect. Dis**. 2010.10, 733–736.

GRYSEELS, B.; POLMAN, K.; CLERINX, J.; KESTENS, L. Human schistosomiasis. **Lancet**. 2006. 368, 1106–1118

GRIESHABER, D.; MACKENZIE, R.; VOROS, J.; REIMHULT, E.; Electrochemical Biosensors – Sensor Principles and Architectures, **Sensors** 2008, 8, 1400-1458

GRIFFIN, J.; SINGH, A.K.; SENAPATI, D.; RHODES, P.; MITCHELL, K.; ROBINSON, B.; YU, E.; RAY, P.C. Size- and distance-dependent nanoparticle surface-energy transfer (NSET) method for selective sensing of hepatitis C virus RNA. **Chemistry** 2009, 15, 342-351 56 Hafeli, O.; Chastellain, M. Nanoparticulates as drug carriers. Imperial College Press, Londres, 2006.

HARRIS, D. C. Análise Química Quantitativa. 6. ed. Rio de Janeiro: **LTC**, 2005. 876 p

HASAN, S. A Review on Nanoparticles: Their Synthesis and Types. **Research Journal of Recent Sciences**. 2014, 4, 1-3.

HIDEAKI NAKAMURA E ISAO KARUBE. Current research activity in Biosensors, **Anal. Bional. Chem.** vol. 377, pp. 446-468, 2003

HOLLAND, H.; YAMAMURA, M. Adsorção de íons urânio em nanopartículas de magnetita. **Associação Brasileira De Energia Nuclear**: Rio de Janeiro (2009).

IBIRONKE, O.A., PHILLIPS, A.E., GARBA, A., LAMINE, S.M., SHIFF, C., Diagnosis of Schistosoma haematobium by detection of specific DNA fragments from filtered urinesamples. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 84. 2011., 998–1001

JESUS, A. R.; MAGALHAES, A.; MIRANDA, D. G.; MIRANDA, R. G.; ARAUJO, M. I.; DE JESUS, A. A. et al. Association of type 2 cytokines with hepatic fibrosis in human *Schistosoma mansoni* infection.. **Infect Immun** 2004; 72:3391-3397

JOHNSON, P. V.; PARK AND, H. J.; DRISCOLL, A. J. "Enzyme Nanoparticle Fabrication: Magnetic Nanoparticle Synthesis and Enzyme Immobilization," **Methods in Molecular Biology**, Vol. 679, 2011, pp. 183-191.

JUN, Y.W.; HUH, Y.M.; CHOI, J.S.; LEE, J.H.; SONG, H.T.; KIM, S.; et al. Nanoscale size effect of magnetic nanocrystals and their utilization for cancer diagnosis via magnetic resonance imaging. **J. Am. Chem. Soc.** 127 (2005) 5732–5733. 57

KAUSHIK, A.; KHAN, R.; SOLANKI, P. R.; PANDEY, P.; ALAM, J.; AHMAD, S.; MALHOTRA, B. D. **Biosensors and Bioelectronics** 2008, 24, 676–683

KATZ, N., CHAVES, A., PELLEGRINO, J., (1972). **Rev. Inst. Med. Trop.** Sao Paulo 14, 397—400.

KIM, D.K.; MIKHAYLOVA, M.; WANG, F.H.; KEHT, J.; BJELKE, B.; ZHANG, Y.; et al. Magnetic core-bilayer shell nanoparticle: A novel vehicle for entrapment of poorly water-soluble drugs. **Chem. Mater.** 15 (2003) 4343–4351.

KING, C.H. Parasites and poverty: the case of schistosomiasis. **Acta Trop.** 2010. 113,95–104.

KRANZ, C.; EATON, D. C.; MIZAIKOFF, B.; **Anal. Bioanal. Chem.** 2011,399,2309

KOUASSI, G. K.; IRUDAYARAJ, J.; MCCARTY, G. **BioMagnetic Research and Technology** 2005, doi:10.1186/1477-044X-3-1

KURALAY, F.; ÖZYÖRÜK, H.; YILDIZ, A. Potentiometric enzyme electrode for urea determination using immobilized urease in poly(vinylferrocenium) film. **Sensors and Actuators B: Chemical**, 109 (2), p. 194-199, 2005

LAMBERTUCCI J, SILVA L, VOIETA I. Esquistossomose Mansônica. In: Coura JR, editor. Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**; 2005. p. 931-946.

LAMBERTUCCI, J. R. “Acute schistosomiasis mansoni: revisited and reconsidered,” **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 105, no. 4, pp. 422–435, 2010.

LAWACZECK, R.; MENZEL, M.; PIETSCH, H. Superparamagnetic iron oxide particles contrast media for magnetic resonance imaging. *Appl. Organomet. Chem.* 18 (2004) 506–513 58

LEAL, R. Estudo da magnetita como material adsorvedor de íons urânio. Instituto de pesquisas energéticas e nucleares - "**Autarquia associada à Universidade de São Paulo**". São Paulo, 2006.

LEMAN, J. A.; SMAL, L. G.; WILKS, D.; TIDMAN, M. J. Localized papular cutaneous schistosomiasis: two cases in travellers. **Clinical and Experimental Dermatology** 2001; 26: 50-2.

LI, F.; FENG, Y.; DONG, P.; TANG, B. Gold nanoparticles modified electrode via a mercapto-diazoaminobenzene monolayer and its development in DNA electrochemical biosensor.. **Biosens. Bioelectron.** 25 (2010) 2084.

LI, F.; HAN, X.; LIU, S. Development of an electrochemical DNA biosensor with a high sensitivity of fM by dendritic gold nanostructure modified electrode. **Biosens. Bioelectron.**, 26 (2011), pp. 2619–2625.

LIBERTI, P.A.; RAO, C.G.; TERSTAPPEN, L.W.M.M. Optimization of ferrofluids and protocols for the enrichment of breast tumor cells in blood. **J. Magn. Magn. Mater.** 225 (2001) 301–307

LOUREIRO, F. C. C. L.; ARLINGO, G. S. B. N., CLEUMAR, S. M., ANTONIO, M. N. LIMA., HELMUT, N. A method for determining the mutual diffusion coefficient of molecular solutes based on surface plasmon resonance spectroscopy, *Sensors and Actuators B, Chemical*, vol. 1, pp. 1-8, 2010.

LYON, J. L.; FLEMING, D. A.; STONE, M. B.; SCHIFFER, P.; WILLIAMS, M. E. Synthesis of Fe Oxide Core/Au Shell Nanoparticles by Iterative Hydroxylamine Seeding. *Nano Letters* 4, 719 (2004).

LOAIZA, O. A.; JUBETE, E.; OCHOTECO, E.; CABAÑERO, G.; GRANDE, H.; RODRIGUEZ, J. *Biosensors and Bioelectronics* 26, 2194 (2011).] 59

LOJOU, É.; BIANCO, P.; (2006). Application of the electrochemical concepts and techniques to amperometric biosensor devices. *J. Electroceram.* 16, 79-91.

MALIK P, KATYAL V, MALIK V, ASATKAR A, INWATI G, MUKHERJEE TK. Nanobiosensors: Concepts and Variations. *ISRN Nanomater* [Internet]. 2013;2013:1–9. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/isrn/2013/327435/>

MATAS, S. L. A.; Neuroesquistossomose. *Rev. Neurociências* 9(1): 27-31, 2001

MEHRVAR, M., ABDI, M. Recent Developments, Characteristics, and Potential Applications of Electrochemical Biosensors. *Analytical Sciences*, 2004, 20(8), 1113.

MELO, A. L.; COELHO, P. M. Z. *Schistosoma mansoni*. In: Neves DP, Melo AL, Genaro O, Linardi PM (eds) *Parasitologia Humana*, 10ª edição, Editora Atheneu, São Paulo, p. 174-193, 2000.

MELLO, L. D.; KUBOTA, L. T. Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. *Food Chemistry*, 77, 237–256, 2002.

MENA, M .L.; YÁÑEZ-SEDEÑO, P.; PINGARRÓN, J. M. A comparison of different strategies for the construction of amperometric enzyme biosensors using gold nanoparticle-modified electrodes. **Analytical Biochemistry**, v. 336, n. 1, p. 20-27, Jan. 2005.

MIKKELSEN, S. R.; CORTÓN, E. **Bioanalytical chemistry**. New York: Wiley, 2004

MOLYNEUX, D. H. Combating the “other diseases” of MDG 6 changing the paradigm to achieve equity and poverty reduction? **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 2008. 102, 509–519. 60

MOREIRA, C. S.; LIMA, A. M. N.; THIRSTRUP, C.; NEFF, H. A disposable, low cost prism-based surface plasmon resonance (SPR) biosensor, World Congress on Biosensors 2010: **Biosensors** 2010, 2010

MORENO-CARVALHO, O. A.; NASCIMENTO-CARVALHO, C. M.; BACELAR, A. L, ANDRADE-FILHO, A.; COSTA, G.; FONTES, J. B.; ASSIS, T. Clinical and cerebrospinal fluid (CSF) profile and CSF criteria for the diagnosis of spinal cord schistosomiasis. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria** 61:353-358, 2003

MORF, P.; RAIMONDI, F.; NOTHOFF, H. G.; SCHNYDER, B.; YASUDA, B.; WESSELS, J. M.; JUNG, T. A. **Langmuir** 2006, 22, 658–663.

NIE, J. ZHANG, Y. WANG, H. WANG, S. SHEN, G. Superhydrophobic surface-based magnetic electrochemical immunoassay for detection of *Schistosoma japonicum* antibodies, **Biosens Bioelectron**, 33 (2012) 23-28.

NETTO, C. G. C. M.; TOMA, H. E.; ANDRADE, L. H. Journal of Molecular Catalysis **B: Enzymatic** 2013, 85-86, 71–92.

NINOSKA I. B.; RAMÍREZ, M.; FORTES, A. M. S.; BELKIS, V. Construcción de un Inmunosensor Amperométrico utilizando Apirasa de *Solanum tuberosum* para la Detección de Esquistosomiasis. **Información Tecnológica**. Vol. 20(3), 125-134 (2009)

PALECEK, E.; FOJTA, M. Detecting DNA hybridization and damage. **Analytical Chemistry**, v. 73, n. 3, p. 74a-83a, Feb. 2001

PALECEK, E. Past, present and future of nucleic acids electrochemistry. **Talanta**, v. 56, n. 4, p. 806-819, Oct. 2002 61

PALEČEK E. Fifty years of nucleic acid electrochemistry. **Electroanalysis**. 2009;21(3-5):239–51.

PATHAK, P.; KATIYAR, V. K.; GIRI, S. Cancer Research - Nanoparticles, Nanobiosensors and Their Use in Cancer Research. AZojono **Journal of Nanotechnology Online**. 2007. v.3, set.

PATOLSKY, F.; RANJIT, K. T.; LICHTENSTEIN, A.; WILLNER, I. **Chem. Commun.** (2000) 1025.

PEJCIC, B.; DE MARCO, R.; Impedance spectroscopy: Over 35 years of electrochemical sensor optimization, **Electrochimica Acta** 51, 6217–6229, 2006

PEREZ, E. H. Ectopic cutaneous schistosomiasis. **Int J Dermatol** 2004; 43: 550-2.

PERINOTTO, A. C.; CASELI, L.; HAYASAKA, C. O.; RIUL, A.; OLIVEIRA, O. N.; ZUCOLOTTI, V.; **Thin Solid Films** 2008,. 51,-69

PERNAMBUCO. Secretaria Estadual de Saúde. Secretaria Executiva de Vigilância em Saúde. **Plano Integrado de Ações para o Enfretamento às Doenças Negligenciadas no Estado de Pernambuco/ SANAR – 2015 - 2018** / Secretaria Estadual de Saúde.

Secretaria Executiva de Vigilância em Saúde. – Recife: Secretaria Estadual de Saúde, 2015. 46p. : il. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos)

PINGARRÓN, J. M.; SEDEÑO, P. Y.; CORTÉS, A. G. Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors. **Journal Electrochimica Acta**, V. 53, p. 5848–5866, 2008.

PINTO, E. P.; RAMOS, G. Q.; FONSECA FILHO, H.D. O Microscópio de Força Atômica (AFM): importante ferramenta no estudo da morfologia de superfícies na escala manométrica. **Macapá**, v. 3, n. 2, p. 41-50, jul.-dez. 2013 62

PIVIDORI, M. I.; MERKOÇI, A.; ALEGRET, S. Electrochemical genosensor design: immobilization of oligonucleotides onto transducers surfaces and detection methods. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 15, n. 5-6, p. 291-303, Aug. 2000.

PIVIDORI, M. I.; LERMO, A.; ZACCO, E.; HERNÁNDEZ, S.; FABIANO, S.; ALEGRET, S. Bioaffinity platforms based on carbon-polymer biocomposites for electrochemical biosensing. **Thin Solid Films**, v, 516, n. 2-4, p. 284-292, Dec. 2007.

PODEROSO, W. L. S.; SANTANA, W. B.; COSTA, E. F; CIPOLOTTI, R.; FAKHOURI, R. Ectopic schistosomiasis: description of five cases involving skin, one ovarian case and one adrenal case. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** vol.41 no.6 Uberaba Nov./Dec. 2008

POHANKA M. y P. Skladal; Electrochemical biosensors – principles and applications, Review, **J. Appl. Biomed.**: 6, 57-64 (2008), ISSN 1214-0287

PORDEUS, C. L.; AGUIAR, R. L.; QUININO, M. L. R.; BARBOSA, C. S. A ocorrência das formas aguda e crônica da esquistossomose mansônica no Brasil no período de 1997 a 2006: uma revisão de literatura. **Epidemiol Serv Saúde** 2008;17(3):163-75.

QIU, J. D.; PENG, H. P.; ANG, R. P. L.; XIA, X. H. **Biosensors and Bioelectronics** 25, 1447 (2010).

RADWA, E. E.; MOHAMMED, B.; SHEREEN F. MOSSALLAM, I. A. EGLAL, M. A. HAMIDA. A. M. KHALIL. Combination of the two schistosomal antigens Sm14 and Sm29 elicits significant protection against experimental *Schistosoma mansoni* infection. **Experimental Parasitology** 145 (2014) 51–60.

ROLLEMBERG C, QUINTANS J, SANTOS R. Avaliação do Programa de Controle de Esquistossomose no Bairro Santa Maria, Aracaju, Sergipe, sob a perspectiva farmacêutica. **Rev FAPES** 2008; 4:63-82 63

ROLLEMBERG, C. V. V. Aspectos epidemiológicos e distribuição geográfica da esquistossomose e geo-helminthos, no Estado de Sergipe, de acordo com os dados do Programa de Controle da Esquistossomose. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 2011. 44(1), 91-96

ROLLINSON, D.; KNOPP, S.; LEVITZ, S.; STOTHARD, J. R.; TCHUENTÉ, L. T.; GARBA, A.; MOHAMMED, K. A.; SCHUR, N.; PERSON, B.; COLLEY, D. G., UTZINGER, J. Time to set the agenda for schistosomiasis elimination. **Acta Tropica** 128 (2013) 423– 440.

ROSATTO, S. S.; FREIRE, R. S.; DURÁN, N, KUBOTA, L. T.; Biossensores Amperométricos para Determinação de Compostos Fenólicos em Amostras de Interesse Ambiental. **Química Nova**. v. 24, p. 77- 86, 2001

ROSS, A. G. P.; BARTLEY, P. B.; SLEIGH, A. C, OLDS, G. R.; LI, Y.; WILLIAMS, G. M.; MCMANUS, D. P. Schistosomiasis. **N Eng J Med** 2002; 346:1212-9.

SALEHIZADEH, H.; HEKMATIAN, E.; SADEGHIAN, K.; KENNEDY, M. **Journal of Nanobiotechnology** 10, 3 (2012).

SANTOS, A.R. Esquistossomose. **Fundação Nacional da Saúde** – Gerência Técnica de Esquistossomose. Disponível em – <http://www.funasa.gov.br/acoes/doencas/esquis/esquis.htm>.

SCHREIBER, F.; EBERHARDT, A.; LEUNG, T. Y. B.; SCHWARTZ, P. WETTERER, S. M.; LAVRICH, D. J.; BERMAN, L. P. FENTER, P. EISENBERGER, G. SCOLES, **Physical Review B** 57 (1998) 12474-12481

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. Princípios de Análise Instrumental. 5. ed. Porto Alegre: **Bookman**, 2002. 836 p.

SHI A, WANG J, HAN X, FANG X, ZHANG Y. A sensitive electrochemical DNA biosensor based on gold nanomaterial and graphene amplified signal. **Sensors Actuators, B Chem** [Internet]. Elsevier B.V.; 2014;200:206–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2014.04.024>

SILVA, B. V. M.; CAVALCANTI, I. T.; MATTOS, A. B.; MOURA, P.; SOTOMAYOR, M. D. P. T.; DUTRA, R. F. Disposable immunosensor for human cardiac troponin T based on streptavidin-microsphere modified screen-printed electrode. **Biosens. Bioelectron.**, 26, 1062–1067, 2010.

STEVANATTO, L. C.; BRUSAMARELLO, V. J.; TAIROV, S. Parameter identification and analysis of uncertainties in measurements of lead-acid batteries. IEEE trans. **Instrum. Meas.** Vol 63, no. 4, pp 761-768. 2014

SINGH, M.; VERMA, N.; GARG, A.K.; REDHU, N.; (2008). Urea Biosensors – Review. **Sensors and Actuators B: Chem.**, doi:10.1016/j.snb.2008

SONG, S.; XU, H.; FAN. C. Potential Diagnostic Applications of Biosensors: Current and Future Directions. **International Journal of Nanomedicine**, v.1, n.4, p.433-440, 2006.

SOUZA, F.A; SANTOS, I. Disseminação da Esquistossomose Mansônica na Região de Santa Cruz das Palmeiras-SP. **Rev. LOGOS**, 16 p.43, 2008.

STOTHARD, J.R., SOUSA-FIGUEIREDO, J.C., STANDLEY, C., VAN DAM, G.J., KNOPP, S., UTZINGER, J., AMERI, H., KHAMIS, A.N., KHAMIS, I.S., DEELDER, A.M., MOHAMMED, K.A., ROLLINSON, D., An evaluation of urine-CCA strip test and fingerprick blood SEA-ELISA for detection of urinary schistosomiasis in schoolchildren in Zanzibar. **Acta Trop.** 111. 2009., 64–70 65

SUÁREZ, G., SANTSCHI, C., MARTIN, O.J.F., SLAVEYKOVA, V.I., Biosensor based on chemically-designed anchorable cytochrome c for the detection of H₂O₂ released by aquatic cells. **Biosens. Bioelectron.** 42 (0), 2013.. 385–390.

TAN, S.T.; WENDORFF, J.H.; PIETZONKA, C.; JIA, Z.H.; WANG, G.Q. Biocompatible and biodegradable polymer nanofibers displaying superparamagnetic properties. **Chem. Phys. Chem.** 6 (2005) 1461–1465.

TEN HOVE, R.J., VERWEIJ, J.J., VEREecken, K., POLMAN, K., DIEYE, L., VAN LIESHOUT, L., Multiplex real-time PCR for the detection and quantification of *Schistosoma mansoni* and *S. haematobium* infection in stool samples collected in northern Senegal. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 102, 2008..179–185.

THASSU, D.; DELEERS, M.; PATHAK, Y. Nanoparticulate drug delivery systems. **Informa Healthcare**, New York, 2007.

TIBIRIÇA, S.H.C. Epidemiologia da Esquistossomose em três Municípios da Microrregião de Juiz de Fora, Minas Gerais. **Tese de Doutorado**, Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil, 2008.

TIMBÓ, M.J.M; LIMA, J.W.O. Esquistossomose: uma visão geral do problema. **Rev. Medicina do Ceará**, 39(1-2) p. 1-14, 1999.

TRANQUILLINI, G.; DE FREITAS F. H. I.; TADEU V. R.; GUEVARA S. L. A.; LEITÃO, R.; BEDIN, V. Esquistossomose cutânea ectópica: relato de caso. **Med Cutan Iber Lat Am** 2011;39(6):268-271)

THÉVENOT, D. R.; TOTH, K.; DURST, R. A.; WILSON, G. S. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classifications. **Biosens. Bioelectron.**, 16, 121–31, 2001. 66

UTZINGER, J.; RASO, G.; BROOKER, S.; DE SAVIGNY, TANNER, M.; ORNBJERG, N.; SINGER, B. H.; N'GORAN, E. K. Schistosomiasis and neglected tropical diseases: towards integrated and sustainable control and a word of caution. **Parasitology**. 2009.136,1859–1874

UTZINGER, J.; N'GORAN, E. K.; CAFFREY, C. R.; KEISER, J. From innovation to application: social-ecological context, diagnostics, drugs and integrated control of schistosomiasis. **Acta Trop**. 2011. 120 (Suppl. 1), S121–S137.

VLADIMIR, L.; ALEXEEV, S. D.; DAVID, N. F.; SANFORD, A. A. Photonic Crystal Glucose-Sensing Material for Noninvasive Monitoring of Glucose in Tear Fluid. **Clinical Chemistry**, n. 50, p. 2353- 2360, 2004.

VIDOTTI, M. ;CARVALHAL, R. F.; MENDES, R. K.; FERREIRA, D. C. M.;KUBOTA, L. T. Biosensors Based on Gold Nanostructures. **J.Braz.Chem.Soc.**, Vol.22, No.1, 3-20, 2011.

VITORINO, R. R.; SOUZA, F. P. C.; COSTA, A. P.; FARIA JÚNIOR, F. C.; SANTANA, L. A.; GOMES, A. P. Schistosomiasis mansoni: diagnosis, treatment, epidemiology, prophylaxis and control. **Rev Bras Clin Med**. São Paulo, 2012 jan-fev;10(1):39-45

- VO-DINH, T.; Nanotechnology in biology and medicine: methods, devices and applications. **Taylor & Francis Group**, Boca Raton, 2007.
- WANG, J. From DNA Biosensors to Gene Chips. **Nucleic Acids Research**. 2000. v.28, n.16, p.3011-3016.
- WANG, M.; SUN, C.; WANG, L.; JI, X.; BAI, Y.; LI, T.; LI, J. J. **Pharm. Biomed. Anal.** 33 (2003) 1117
- WANG, J.; ZHANG, S.; ZHAN, Y. **Anal. Biochem.** 396 (2010) 304. 67
- WANG S, YIN T, ZENG S, CHE H, YANG F, et al. A Piezoelectric Immunosensor Using Hybrid Self-Assembled Monolayers for Detection of *Schistosoma japonicum*. (2012) **PLoS ONE** 7(1): e30779. doi:10.1371/journal.pone.0030779
- WANG, Y.; ZHOU, A. Spectroscopic studies on the binding of methylene blue with DNA by means of cyclodextrin supramolecular systems. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 190, n. 1, p. 121-127, July 2006.
- WEISS, M. G. Stigma and the social burden of neglected tropical diseases. **PLoS Negl. Trop. Dis.** 2008.2, e237.
- WICHMANN, D., PANNING, M., QUACK, T., KRAMME, S., BURCHARD, G.D., GREVELDING, C., DROSTEN, C., 2009. Diagnosing schistosomiasis by detection of cell-free parasite DNA in human plasma. **PLoS Negl. Trop. Dis.** 3, e422.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Elimination of schistosomiasis in low transmission areas: Salvador, Bahia, 18-19 Aug. 2008. Geneva, 2009. Report of the WHO informal

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Schistosomiasis. Disponível em: <www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/>. Acesso em: 01 jun. 2014.

YANG, J.; PARK, S.B.; YOON, H.G.; HUH, Y.M.; HAAM, S. Preparation of poly_ε-caprolactone nanoparticles containing magnetite for magnetic drug carrier. **International Journal of Pharmaceutics**. 324 (2006) 185-190.

YANG, L.; REN, X.; TANG, F.; ZHANG, L. **Biosensors and Bioelectronics** 2009, 25, 889– 895.

ZHAO, X.; CAI, Y.; WANG, T.; SHI, Y.; JIANG, G. **Analytical Chemistry**. 80, 9091 (2008). 68

ZHOU, Y.M., HU S.Q., CAO, Z.X., SHEN, G.L, YU, R.Q. **Anal. Lett.**, 35 (12) (2002a), p. 1919

ZHOU, Y.M., LIU, G.D., WU, Z.Y., SHEN, G.L., YU, R.Q. **Anal. Sci.**, 18 (2002b), p. 155

ZHOU, X.; BERGQUIST, R.; OLVEDA, R.; UTZINGER, J. Important Helminth Infections in Southeast Asia: Diversity and Potential for Control and Elimination, 2009. Parte 1. Volume 72 de **Advances in Parasitology**.480p.

ZHOU, X. N, GUO, J. G, WU, X.H, WU, Q.J, ZHENG J, et al. (2007) Epidemiology of schistosomiasis in the Peoples' Republic of China, 2004. **Emerging Infectious Diseases** 13: 1470–1476.

ZHU, N. N.; CHANG, Z.; HEB, P. G.; FANG, Y. Z. **Anal. Chim. Acta** 545 (2005) 21

ZHU, N. N.; XU, Q.; LI, S.N.; GAO H. **Electrochem. Commun.**, 11 (12) (2009), p. 2308

APÊNDICE A - Artigo Científico

IMPEDIMETRIC NANOSTRUCTURED GENOSENSOR FOR DETECTION OF
SCHISTOSOMIASIS IN CEREBROSPINAL FLUID AND SERUM SAMPLES

Artigo submetido à revista Sensors and Actuators B.

IMPEDIMETRIC NANOSTRUCTURED GENOSENSOR FOR DETECTION OF SCHISTOSOMIASIS IN CEREBROSPINAL FLUID AND SERUM SAMPLES

Giselle, S. Santos ¹, Cesar A.S. Andrade², Fabio, L. Melo³, Maria D.L. Oliveira^{1,2}

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brasil

²Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brasil

³Laboratório de Doenças Transmissíveis, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, 50670-420 Recife, PE, Brazil

*To whom correspondence should be addressed.

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

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

E-mail: m_danielly@yahoo.com.br

Abstract

Schistosomiasis is a neglected disease closely related to the low levels of social development and a serious public health problem. In this work, we performed an electrochemical detection of *Schistosoma mansoni* DNA with a self-assembled monolayer of mercaptobenzoic acid (MBA) immobilizing nanostructures composed by gold nanoparticles (AuNPs) and magnetite nanoparticles (Fe_3O_4 -NPs). Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS) and Cyclic Voltammetry (CV) were used to monitor the biorecognition event. MBA- Fe_3O_4 -NPs-AuNPs-DNAprobe system reveals an effective electrochemical response indicating the surface modification. The proposed biosystem was capable to recognize specific nucleotide sequence of *S. mansoni* present in cerebrospinal fluid (CFS) serum samples at different genome DNA concentrations. The biorecognition results in an increase in the electron transfer resistance and a decrease of the current peaks at higher DNA concentrations during electrochemical measurements. The developed platform showed a DNA detection limit of 0.781 and 0.685 $\text{pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ for serum and CFS, respectively. Therefore, the obtained biosensor can be considered as a useful tool for specific detection of *S. mansoni* at low concentrations in various biological fluids.

Keywords: Biosensors; Schistosomiasis; DNA; Cyclic Voltammetry; Impedance Spectroscopy; Metal Nanoparticles.

1. Introduction

Schistosomiasis is an important parasitic disease for public health caused by helminth *Schistosoma mansoni* [1], which can be found in many tropical regions of the globe [2]. Some studies have reported six to seven million people affected in Brazil [3, 4] with higher prevalence in Northeast states [2] and Southeast states [5, 6].

A severe form of *S. mansoni* is the ectopic schistosomiasis that can manifest in different ways, especially involving the nervous system [7]. In these infections, spinal cord is more frequently affected than the brain [8]. The early treatment of the disease is essential for a good prognosis and preventing indiscriminate use of drugs by patients. Therefore, it is necessary the development of affordable diagnostic techniques with high sensibility and specificity [9]. Schistosomiasis diagnosis is based on the analysis of faecal samples and cerebrospinal fluid (CSF) for nervous system manifestation [7, 10]. Some diagnostic tests such as ELISA, indirect fluorescence immunoassay, radioimmunoassay are also commonly used [11]. In general, diagnostic tests require expensive equipment and supplies, specialized technicians and are time-consuming [12].

In this context, electrochemical genosensors have been used as an excellent alternative for the development of new methods for diagnosis [13, 14]. Electrochemical techniques reveal changes in the electrical properties of the electrode surface such as resistance and capacitance [15]. Impedimetric nanosensors are promising due to their potential for rapid detection of DNA sequences with low cost and sensitivity [15, 16].

The association of metal nanoparticles have yielded nanostructured materials with distinctive properties [17]. Of note, the improved electroanalytical performance of nanostructured sensors is attributed to their high conductivity, large surface area, stability and biocompatibility [18]. In particular, optical, magnetic and catalytic

properties of solid surfaces can be improved using magnetite (Fe_3O_4 -NPs) and gold nanoparticles (AuNPs) [19-21]. Fe_3O_4 -NPs and AuNPs have been used as platforms for the development of biosensors due to the ability to provide a stable immobilization of large amount of biomolecules and improvement of the biocompatibility [22, 23] .

In this work, we reported the construction of new highly sensitive electrochemical genosensor based on self-assembled monolayers of mercaptobenzoic acid (AMB) for *S. mansoni* detection. Aminated- Fe_3O_4 -NPs and AuNPs were immobilized on AMB layers (Fig. 1). To the best of our knowledge is the first time that an electrochemical platform is developed for specific detection of *S. mansoni*.

2. Experimental

2.1. Materials

S. mansoni samples were provided by the Parasitology Laboratory Aggeu Magalhães Research Center (Recife, Brazil). All samples were previously characterized using RT-qPCR.

Mercaptobenzoic acid (AMB), gold(III) chloride hydrate ($\text{HAuCl}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$), (3-aminopropyl)triethoxysilane (APTES), trisodium citrate, bovine serum albumin (BSA), 1-[3-(dimethylamino)propyl]-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) and N-hydroxysuccinimide (NHS) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Ammonium hydroxide (NH_4OH), potassium ferri- and ferrocyanide were obtained from VETEC (Brazil). All other chemicals used in this work were reagent-grade quality and used as received without further purification. Ultrapure water was obtained from a Millipore Milli-Q system.

2.2. Sample preparation

CSF samples (1 mL) from all patients and controls were collected by lumbar puncture. CSF analysis consisted of general and specific cell count, CSF glucose, CSF protein, protein electrophoresis and immunological determinations for schistosomiasis (ELISA), herpes, syphilis, cysticercosis, toxoplasmosis, cytomegalovirus, Epstein-Barr virus, human immunodeficiency virus, varicella zoster, *Cryptococcus* and human cell lymphotropic virus. These samples were also analyzed in according to Brusky [10] using NPCR, at the Aggeu Magalhães Research Center in FIOCRUZ, Pernambuco state.

Schistosoma DNA was purified using the illustra tissue & cells genomic Prep Mini Spin Kit (GE Healthcare, UK) in according to the manufacturer's instructions. The DNA in CSF samples from patients was extracted and purified which using the illustra blood genomicPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare, UK) in according to the manufacturer's instructions. Thus, it was quantified in a spectrophotometer and stored at -20°C . The thiolated primer used was Schfo17 (5'-GTGCTGGTGGGTTGACGAGTTC-3'). This primer was specific for *S. mansoni* [24].

2.2. Synthesis of nanoparticles

Gold nanoparticles were synthesized using Frens method [25]. Initially, 0.01 wt% $\text{HAuCl}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ (100 mL) was boiled under vigorous stirring in a flask. Trisodium citrate solution (2.5 mL, 1% w/v) was added quickly to the boiling solution, resulting in a color change from pale yellow to dark red, indicating the formation of AuNPs. Then, the solution was maintained at boiling temperature for 10 min.

APTES-modified Fe_3O_4 _NPs were obtained according to Gan et al. [26]. Initially, 0.2g Fe_3O_4 _NPs were added to 90 mL ethanol. Subsequently, 2 mL NH_4OH (25%) and 300 μL APTES were added to the previous solution, and stirred overnight.

Then, the product was magnetically separated and washed three times with deionized water to obtain aminated-Fe₃O₄_NPs.

2.3. *Electrode modification*

The bare gold electrode (BGE) was polished with sandpaper and deionized water. Subsequently, BGE was immersed in a piranha solution for 5 min, dried at room temperature and incubated with 2 μ L AMB after washing with deionized water. Then, was added 2 μ L of equal parts (1:1) of 0.4M EDC and 0.1M NHS on the electrode surface for a period of 10 min in order to activate AMB carboxylic groups. After, 2 μ L aminated-Fe₃O₄_NPs was dropped on the MBA-EDC/NHS-modified electrode following incubation for 10 min. Then, the residual protonated amine groups of MBA-Fe₃O₄_NPs was modified with AuNPs to obtain (MBA-Fe₃O₄_NPs-AuNPs) using the same EDC/NHS method. Finally, thiolated DNA probe was immobilized on the AuNPs surface. Figure 1 shows the manufacturing process of the MBA-Fe₃O₄_NPs-AuNPs-DNAprobe system. BSA was used in all experiments to avoid non-specific interactions.

2.4. *Hybridization analysis*

Target DNA was diluted in 10 mM phosphate-buffered saline (PBS) solution (pH 7.4) and heated (3 min at 40°C) before the experiments. The hybridization was carried out by simple drop-coating technique using 2 μ L of the target DNA obtained from human serum and CSF at different concentrations.

2.5. *Electrochemical measurements*

Electrochemical analyses were performed using a PGSTAT 128N potentiostat/galvanostat (Autolab, Netherlands) with a three electrode conventional electrochemical cell. All experiments were performed in the presence of a 10 mM K₄[Fe(CN)₆]⁴⁻/K₃[Fe(CN)₆]³⁻ solution (1:1) used as a redox probe. BGE was used as work

electrode. Platinum wire electrode and Ag/AgCl (saturated KCl) were used as auxiliary and reference electrodes, respectively. Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS) experiments were performed at a frequency between 100 mHz and 100 kHz, with an alternating voltage adjusted to an amplitude of 10 mV. CV analysis were performed in the range of potentials between +0.7 V and -0.2 V at a scan rate of 50 mV.s⁻¹. All electrochemical measurements were performed in triplicate using three different samples (n = 3).

2.6 Atomic force microscopy measurements

Structural analyses of the system were performed using an atomic force microscope (SPM-9700, Shimadzu Corporation, Japan) in a noncontact mode in air at room temperature (approximately 25°C) [27]. Cantilevers with a silicon AFM probe (Nanoworld, Japan, resonant frequency = 300 kHz, spring constant = 42 N.m⁻¹) were used. The images (512 points per line) were collected with a scan rate of 1.0 Hz in a scan area of 7.0 × 7.0 μm. To eliminate artifacts, images were obtained from at least two macroscopically-separated areas on each sample and analyzed using AFM Gwyddion software [28].

3. Results and Discussion

3.1 Morphological evaluation

Fig. 2a shows MBA modified-BGE surface with the presence of peaks distributed along of the BGE surface and roughness about 56 nm. Then, after modification of MBA self-assembled layer with Fe₃O₄_NPs and AuNPs, it can be observed the presence of small-dispersed nanoparticles with a heterogeneous distribution on the surface (Fig. 2b). Subsequently, DNA probe immobilization results in a surface roughness of 84 nm (Fig. 2c), in according to previous results reported in the literature [20, 29]. The interaction

between *S. mansoni* sample and the sensor surface was evaluated and significant changes in the topography were observed (Fig. 2d). However, the binding of a non-complementary target does not cause significant changes (Fig. 2e), demonstrating the specificity of the sensor.

3.2 Voltammetric characterization

Fig. 3a shows the voltammetric response of the stepwise fabrication process of the sensor. Initially, BGE voltammetric curve showed a characteristic behavior of a process limited by diffusion of the redox probe. As explained before, BGE was subsequently modified with MBA, which contains a thiol group enabling its adsorption on the metal surface and resulting in a self-assembled monolayer [30-33]. In addition, MBA contains a carboxylic acid functional group that allows a covalent bond with modified nanoparticles [34]. A decrease of the anodic and cathodic peaks is observed due to MBA adsorption. After, MBA carboxylic acid moiety was activated using EDC/NHS coupling reagents. During the reaction, NHS ester group replaced the carboxyl group of AMB and, thus, provides an increase in the current response due to electrostatic interactions [35]. After immobilization of the aminated-Fe₃O₄-NPs on MBA-modified electrode, it was observed an additional decrease in the amperometric electrode response. Subsequently, AuNPs is covalently binding to Fe₃O₄-NPs through EDC/NHS (Fig. 3a).

Finally, thiol-modified DNA probe was adsorbed on the MBA-Fe₃O₄-NPs-AuNPs to obtain the biosensor. MBA-Fe₃O₄-NPs-AuNPs-DNAprobe system revealed a decrease in the amperometric response of the electrode with semi-reversible behavior, since electron-transfer kinetics of $K_4[Fe(CN)_6]^{4-}/K_3[Fe(CN)_6]^{3-}$ is perturbed by hindrance of the electron diffusion (Fig. 3a). Therefore, after oligonucleotide

immobilization a decrease of the redox probe penetration is observed. In particular, after hybridization process with complementary genome a decrease in the anodic and cathodic peaks was obtained (Fig. 3b) due to the specific interaction. Of note, the hybridization process on the electrode acts as a mass-transfer blocking layer and hinders the diffusion of ferricyanide toward the electrode surface [27, 36].

3.3 Electrochemical impedance spectroscopy characterization

EIS technique provides a complete and detailed view of the electrical characteristics of the electrode/solution interface [27, 37]. Fig. 4a shows the Nyquist plots of the stepwise electrode surface modification. A typical Cole-Cole semicircle with two well-defined regions containing a higher frequency region characterized by the electron transfer process and a lower frequency region limited by the diffusion process was obtained [38]. The BGE shows a very small semicircle domain (Fig. 4a) implying a very low electron-transfer resistance (R_{et}) of the redox probe. After, R_{et} was increased again after electrode modification using negatively charged MBA (Fig. 4a). Then, MBA acts as an electrostatic barrier that hinder the ability of the redox probe to access the electrode. EDC:NHS activation and subsequent immobilization of Fe_3O_4 -NPs and AuNPs provide an additional R_{et} increase (Fig. 4). The nanoparticles were immobilized by a simple drop-coating procedure. A new increase in the R_{et} was obtained after association between DNA probe and MBA- Fe_3O_4 -NPs-AuNPs-modified gold electrode (Fig. 4), indicating an obstruction of the electron transfer.

The hybridization process was confirmed after successive blockage of the electron transfer at the sensor surface after genome recognition. Five different concentrations of complementary *S. mansoni* genome ($0.5\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, $0.25\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, $0.62\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, $31.3\text{ pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, $15.6\text{ pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ and $7.8\text{ pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) were tested (Fig. 4b). A successive increase in

the Cole-Cole semicircle is clearly visualized and proportional to the increment of DNA concentration, suggesting a specific interaction between the sensor and *S. mansoni* genome.

The impedance data were fitted to a modified Randles equivalent circuit (Fig. 4c), which includes the solution resistance (R_{sol}), electron transfer resistance (R_{et}), constant phase element (CPE) and Warburg impedance element (W). Ideally, W and R_{sol} represents the bulk properties of the electrolyte solution and diffusion features of the redox probe in solution and, thus, were not affected by modifications of the electrode surface. CPE value is related to the ionic charges, surface area, dielectric constant and thickness of the layer [39]. R_{et} element depends on the insulating feature at the electrode/electrolyte interface. In the present study, the changes in R_{et} were more pronounced than those in other impedance components. Thus, R_{et} was used for sensing the interfacial properties of the developed genosensor for all assembly procedures.

Table 1 shows the equivalent circuit parameters of the fitting curves for all measurements. The obtained results were consistent with CV curves shown in Fig. 3 and revealed a different response for each DNA concentration (Fig. 4). After hybridization process, we observed that the R_{et} values increased significantly, while a reduction of CPE values occurred at the same time. Of note, EIS spectra showed higher R_{et} values for positive samples than for negative target indicating specific interactions between evaluated probe and genomic target.

The results presented in Fig. 4 clearly show that DNA probe was capable to recognize specific genomic target after immobilization as can be seen by the increase of the R_{et} . The performance of the modified electrode for detection of *S. mansoni* genome was evaluated through the relative variation of R_{et} (ΔR_{et}). This variation can be

calculated according to the following equation: $\Delta\text{Ret}(\%)=[(\text{Ret}_{\text{PG}}-\text{Ret}_{\text{P}})/\text{Ret}_{\text{P}}]\times 100$, where Ret_{P} is the value of the electron-transfer resistance of the MBA-Fe₃O₄_NPs-AuNPs-DNAprobe-modified electrode. Ret_{PG} is the value of the electron-transfer resistance of the MBA-Fe₃O₄_NPs-AuNPs-DNAprobe-genome-modified electrode after exposing it to contaminated samples.

An impedimetric evaluation was performed for different concentrations of *S. mansoni* genome (Fig. 4d). A linear relationship between ΔRet and genome concentration was found and the detection limit was estimated to be approximately 0.78 pg. μL^{-1} . ΔRet increases proportionally to *S. mansoni* genome concentration and indicates that the modified electrode can sense the interactions between the probe and genomic target.

In addition, the selectivity of the biosensor was investigated by monitoring changes in the Ret response by incubating with complementary and non-complementary genomic sequences. We used non-complementary genomic sequence from Leishmaniasis as a negative control (0.1 ng. μL^{-1}). The interaction of the biosensor with a non-complementary genomic sequence (negative control) resulted in insignificant values of Ret, revealing the selectivity of the bioelectrode.

A brief information of these results is given in Table 2, for fixed concentrations of genomic target sequence. These results demonstrate that the biosystem retains its capability to recognize specific target as a clear indication that this system could be used for specific detection of *S. mansoni* in clinical samples.

3.4 Detection of *S. mansoni* in cerebrospinal fluid

As previously explained, we developed a sensor platform capable of recognizing *S. mansoni* genome in different biological samples. Therefore, the biosensor was

exposed to cerebrospinal fluid (CSF) to evaluate its effectiveness to other samples. The sensitivity could be observed by the increase of the Cole-Cole semicircle (Fig. 5a) with linear relationship between ΔRet and DNA concentration as shown in Fig. 5b. A correlation coefficient of 0.96 was obtained, indicating that the interactions between probe and genomic target sequence can be sensed by MBA- Fe_3O_4 -NPs-AuNPs-DNAprobe system. The detection limit of $0.685 \text{ pg. } \mu\text{L}^{-1}$ was estimated from the signal-to-noise characteristics of these data ($S/N = 3$). A significant increase in the Ret values were observed after recognition of positive samples (Table 1). Our detection limits were superior to previous reports using monoclonal antibodies for specific detection of *S. mansoni* [40, 41]. Thus, the sensor platform showed good sensitivity being able to detect genomic target at low concentrations of genetic material in CSF.

The filling of the recognition sites (Θ) can be calculated by $\theta=(1-R_{\text{system}})/R_{\text{hybridization}}$, where R_{system} is the Ret of the biosensor and $R_{\text{Hybridization}}$ is the Ret of the biosensor after exposure to different concentrations of the genomic target sequence. Fig. 5c shows a plot of Θ as a function of concentration of the genomic target sequence. The value of Θ increases with increasing DNA target concentration and is found to be 0.69 (69%) at $5.0 \text{ ng. } \mu\text{L}^{-1}$.

The reproducibility of the genosensor using at least three sensors fabricated independently at the same conditions was evaluated. An acceptable reproducibility with a relative standard deviation (R.S.D.) of 4.2% was obtained. Therefore, MBA- Fe_3O_4 -NPs-AuNPs-DNAprobe system is a useful platform for the development of biosensors for specific detection of *S. mansoni* in CSF and serum samples.

4. Conclusion

In this study, electrochemical impedance spectroscopy and cyclic voltammetry were used for the development of a specific biosensor for *S. mansoni*. The developed biosensor showed a good performance for determination of genomic target sequence from *S. mansoni* with low limit of detection, specificity and reproducibility. The developed sensor platform was effective in detecting *S. mansoni* in different biological fluids. These results confirmed that this sensing approach provides a rapid, sensitive and convenient way for detection of *S. mansoni*.

Acknowledgments

G.S. Santos would like to thank FACEPE for a MSc scholarship. M.D.L. Oliveira and C.S.A. Andrade would like to CNPq (grant 302885/2015-3 and 302930/2015-9) and INCT_if.

5. References

- [1] S. Tomczyk, K. Deribe, S.J. Brooker, H. Clark, K. Rafique, S. Knopp, J. Utzinger, G. Davey, Association between footwear use and neglected tropical diseases: a systematic review and meta-analysis, *PLoS Negl Trop Dis*, 8 (2014) e3285.
- [2] R.G. Scholte, L. Gosoni, J.B. Malone, F. Chammartin, J. Utzinger, P. Vounatsou, Predictive risk mapping of schistosomiasis in Brazil using Bayesian geostatistical models, *Acta Trop*, 132 (2014) 57-63.
- [3] T.C. Favre, A.P. Pereira, L.C. Beck, A.F. Galvao, O.S. Pieri, School-based and community-based actions for scaling-up diagnosis and treatment of schistosomiasis toward its elimination in an endemic area of Brazil, *Acta Trop*, 149 (2015) 155-162.
- [4] C.H. King, Parasites and poverty: the case of schistosomiasis, *Acta Trop*, 113 (2010) 95-104.
- [5] W. Tavares, L.A.C. Marinho, Rotinas de diagnóstico e tratamento das doenças infecciosas e parasitárias, 2 ed., São Paulo, 2007.

- [6] B. Ministério da saúde, Guia de vigilância epidemiológica, in: S.d.V.e. Saúde. (Ed.)Brasília, 2009.
- [7] T.C. Ferrari, P.R. Moreira, A.S. Cunha, Clinical characterization of neuroschistosomiasis due to *Schistosoma mansoni* and its treatment, *Acta Trop*, 108 (2008) 89-97.
- [8] T.C. Ferrari, P.R. Moreira, Neuroschistosomiasis: clinical symptoms and pathogenesis, *Lancet Neurol*, 10 (2011) 853-864.
- [9] G. Harter, H. Frickmann, S. Zenk, D. Wichmann, B. Ammann, P. Kern, B. Fleischer, E. Tannich, S. Poppert, Diagnosis of neuroschistosomiasis by antibody specificity index and semi-quantitative real-time PCR from cerebrospinal fluid and serum, *J Med Microbiol*, 63 (2014) 309-312.
- [10] I.S. Bruscky, F.L. de Melo, Z.M. de Medeiros, F.F. Albuquerque, L.B. Wanderley, C. da Cunha-Correia, Nested polymerase chain reaction in cerebrospinal fluid for diagnosing spinal cord schistosomiasis: A promising method, *J Neurol Sci*, 366 (2016) 87-90.
- [11] J.T. Coulibaly, N.K. N’Goran, J. Utzinger, M.J. Doenhoff, E.M. Dawson, A new rapid diagnostic test for detection of anti-*Schistosoma mansoni* and anti-*Schistosoma haematobium* antibodies, *Parasites & Vectors* 6(2013).
- [12] J. Clerinx, E. Bottieau, D. Wichmann, E. Tannich, M. Van Esbroeck, Acute schistosomiasis in a cluster of travelers from Rwanda: diagnostic contribution of schistosome DNA detection in serum compared to parasitology and serology, *J Travel Med*, 18 (2011) 367-372.
- [13] P. Kara, C. Cavusoglu, S. Cavdar, M. Ozsoz, Direct electrochemical genosensing for multiple point mutation detection of *Mycobacterium tuberculosis* during the development of rifampin resistance, *Biosens Bioelectron*, 24 (2009) 1796-1800.
- [14] A.C.H. Castro, E.G. Franc, L.F. de Paula, M.M.C.N. Soares, L.R. Goulart, J.M. Madurro, A.G. Brito-Madurrosince, Preparation of genosensor for detection of specific DNA sequence of the

hepatitis B virus is possible convert the hybridization into a measurable electric signal. ,
Applied Surface Science 314 (2014) 273-279.

[15] A. Bonanni, M. del Valle, Use of nanomaterials for impedimetric DNA sensors: a review,
Anal Chim Acta, 678 (2010) 7-17.

[16] A. Guiseppi-Elie, L. Lingerfelt, Impedimetric Detection of DNA Hybridization: Towards
Near-Patient DNA Diagnostics, Topics in Current Chemistry, 260 (2005) 161-186.

[17] C. Xu, J. Xie, D. Ho, C. Wang, N. Kohler, E.G. Walsh, J.R. Morgan, Y.E. Chin, S. Sun, Au-
Fe₃O₄ dumbbell nanoparticles as dual-functional probes, Angew Chem Int Ed Engl, 47 (2008)
173-176.

[18] F. Li, X. Han, S. Liu, Development of an electrochemical DNA biosensor with a high
sensitivity of fM by dendritic gold nanostructure modified electrode, Biosens Bioelectron, 26
(2011) 2619-2625.

[19] W. Wu, Q. He, C. Jiang, Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis and surface
functionalization strategies, Nanoscale Res Lett, 3 (2008) 397-415.

[20] R. Das, M.K. Sharma, V.K. Rao, B.K. Bhattacharya, I. Garg, V. Venkatesh, S. Upadhyay, An
electrochemical genosensor for Salmonella typhi on gold nanoparticles-mercaptosilane
modified screen printed electrode, J Biotechnol, 188 (2014) 9-16.

[21] T. Rolim, J. Cancino, V. Zucolotto, A nanostructured genosensor for the early diagnosis of
systemic arterial hypertension, Biomed Microdevices, 17 (2015) 3.

[22] S. Liu, J. Liu, L. Wang, F. Zhao, Development of electrochemical DNA biosensor based on
gold nanoparticle modified electrode by electroless deposition, Bioelectrochemistry, 79 (2010)
37-42.

[23] R.D. Zysler, E. Lima Jr, M.V. Mansilla, H.E. Troiani, M.L.M. Pesciotti, P. Gurman, A. Lamagna,
L. Colombo, A New Quantitative Method to Determine the Uptake of SPIONs in Animal Tissue

and Its Application to Determine the Quantity of Nanoparticles in the Liver and Lung of Balb-c Mice Exposed to the SPIONs, *J. Biomed, Nanotechnol*, 9 (2013) 142-145.

[24] F.G. Abath, F.L. Melo, R.P. Werkhauser, L. Montenegro, R. Montenegro, H.C. Schindler, Single-tube nested PCR using immobilized internal primers., *Biotechniques*, 33 (2002).

[25] G. Frens, Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions, *Nature Phys. Sci*, 241 (1973) 20-22.

[26] N. Gan, H. Jin, T. Li, L. Zheng, Fe(3)O(4)/Au magnetic nanoparticle amplification strategies for ultrasensitive electrochemical immunoassay of alfa-fetoprotein, *Int J Nanomedicine*, 6 (2011) 3259-3269.

[27] M.D. Oliveira, C.A. Andrade, M.T. Correia, L.C. Coelho, P.R. Singh, X. Zeng, Impedimetric biosensor based on self-assembled hybrid cystein-gold nanoparticles and CramoLL lectin for bacterial lipopolysaccharide recognition, *J Colloid Interface Sci*, 362 (2011) 194-201.

[28] D. Necas, P. Klapetek, C. Anderson, *Gwyddion*, 2008.

[29] H.Y. Park, M.J. Schadt, L. Wang, I.I. Lim, S., O.N. Njoki, S.H. Kim, M.Y. Jang, J. Luo, C.J. Zhong, Fabrication of Magnetic Core@Shell Fe Oxide@Au Nanoparticles for Interfacial Bioactivity and Bio-separation, *Langmuir*, 23 (2007) 9050-9056.

[30] I. Navratilova, P. Skladal, The immunosensors for measurement of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid based on electrochemical impedance spectroscopy, *Bioelectrochemistry*, 62 (2004) 11-18.

[31] A.J. Bard, L.R. Faulkner, *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, 2 ed., New York, 2000.

[32] J.G. Guan, Y.Q. Miao, Q.J. Zhang, Review impedimetric biosensors, *J. Biosci. Bioeng*, 97 (2004) 219-226.

[33] E. Katz, I. Willne, Probing Biomolecular Interactions at Conductive and Semiconductive Surfaces by Impedance Spectroscopy: Routes to Impedimetric Immunosensors, DNA-Sensors, and Enzyme Biosensors, *Electroanal*, 15 (2003) 913-947.

- [34] H. Wang, H. Ohnuki, H. Endo, M. Izumi, Preparation of Amperometric Glucose Biosensor Based on 4-Mercaptobenzoic Acid, *Physics Procedia*, 14 (2011) 2-6.
- [35] P. Geng, X. Zhang, W. Meng, Q. Wang, W. Zhang, L. Jin, Z. Feng, Z. Wu, Self-assembled monolayers-based immunosensor for detection of *Escherichia coli* using electrochemical impedance spectroscopy, *Electrochimica Acta*, 53 (2008) 4663-4668.
- [36] M.P. Costa, C.A. Andrade, R.A. Montenegro, F.L. Melo, M.D. Oliveira, Self-assembled monolayers of mercaptobenzoic acid and magnetite nanoparticles as an efficient support for development of tuberculosis genosensor, *J Colloid Interface Sci*, 433 (2014) 141-148.
- [37] M.D.L. Oliveira, M.L. Nogueira, M.T.S. Correia, L.C.B.B. Coelho, C.A.S. Andrade, Detection of dengue virus serotypes on the surface of gold electrode based on *Cratylia mollis* lectin affinity, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 155 (2011) 789-795.
- [38] B.A. Boukamp, A Package for Impedance/Admittance data analysis *Solid State Ionics* 19 (1986) 136-140.
- [39] F.B. Diniz, G.F. De Andrade, C.R. Martins, W.M. De Azevedo, A comparative study of epoxy and polyurethane based coatings containing polyaniline-DBSA pigments for corrosion protection on mild steel, *Progress in Organic Coatings*, 76 (2013) 912-916.
- [40] J. Nie, Y. Zhang, H. Wang, S. Wang, G. Shen, Superhydrophobic surface-based magnetic electrochemical immunoassay for detection of *Schistosoma japonicum* antibodies, *Biosens Bioelectron*, 33 (2012) 23-28.
- [41] M. Shohayeb, H. Arida, G.A.M. Mersal, M. El-Badawy, Development of a Nanotechnology-Based Screen-Printed Biosensor for Detection of *Schistosoma Mansoni* Antibodies, *Int. J. Electrochem. Sci*, 11 (2016) 1337-1344.

Table 1

Values of the equivalent circuit elements from fitted impedance results.

Modified electrode	[Genomic target sequence]	$R_{CT}/k\Omega^*$	$Q/\mu F^*$	n^*
Bare gold electrode	-	0.15	1.63	0.36
MBA-Fe ₃ O ₄ _NPs-AuNPs_DNA probe	-	0.75	7.47	0.72
Serum Sample				
Genosensor	7.8 pg. μL^{-1}	1.08	6.92	0.73
Genosensor	15.6 pg. μL^{-1}	1.19	6.78	0.73
Genosensor	31.3 pg. μL^{-1}	1.46	4.52	0.78
Genosensor	0.62 ng. μL^{-1}	1.55	5.85	0.77
Genosensor	0.25 ng. μL^{-1}	2.02	5.53	0.75
Genosensor	0.5 ng. μL^{-1}	2.70	3.98	0.79
CSF Sample				
Genosensor	0.5 pg. μL^{-1}	2.09	3.59	0.77
Genosensor	5.0 pg. μL^{-1}	2.22	3.87	0.76
Genosensor	50 pg. μL^{-1}	2.27	3.63	0.78
Genosensor	0.5 ng. μL^{-1}	2.43	2.98	0.82
Sensor_DNA control negative	-	0.72	8.51	0.71

*Values of the equivalent circuit elements from fitted impedance results.

Table 2

Relative charge transfer variation from impedance data.

Condition	Before [*]	After ¹	After ²	After ³
	Serum Sample		CSF Sample	
Ret/KΩ	0.75	2.70	2.43	0.71
ΔRet (%)	-	260.0	224.0	30.6

- Sensor response before interaction with genomic target sequence; 1-after recognition of complementary genomic target sequence; 2-after recognition of genomic target specific from CSF and, 3-after contact with non-complementary genomic target sequence.

Figure Caption

Figure 1. Schematic representation of the surface modification.

Figure 2. AFM images of the stepwise modification process: a) MBA b) MBA-Fe₃O₄_NPs-AuNPs; c) MBA-Fe₃O₄_NPs-AuNPs-DNAprobe; d) MBA-Fe₃O₄_NPs-AuNPs-DNAprobe- DNA target; e) MBA-Fe₃O₄_NPs-AuNPs-DNAprobe-CSFgenome and, f) MBA-Fe₃O₄_NPs-AuNPs-DNAprobe-negative control.

Figure 3. Cyclic voltammograms of the stepwise modification process (a) and CVs at different stages of biorecognition process (b): BGE (—), MBA-Fe₃O₄_NPs-AuNPs-DNAprobe (—), MBA-Fe₃O₄_NPs-AuNPs-probe-genome (—). Cyclic voltammetry scan was initiated at - 0.2 V vs. Ag/AgCl in positive direction at 50 mV.s⁻¹.

Figure 4. (a) Nyquist plots of the stepwise modification and immobilization process: (■) BGE, (●) MBA, (▲) MBA-EDC/NHS, (▼) MBA-Fe₃O₄_NPs-AuNPs, (◆) MBA-Fe₃O₄_NPs-AuNPs-DNAprobe and (◀) MBA-Fe₃O₄_NPs-AuNPs-DNAprobe-genome. **(b)** Biosensor response when exposed to different concentrations of target genomic DNA and a negative control: (■) BGE, (■) MBA-Fe₃O₄_NPs-AuNPs, (■) MBA-Fe₃O₄_NPs-AuNPs-DNAprobe, (■) Biosensor-genome (7.8 pg.μL⁻¹), (■) Biosensor-genome (15.6 pg.μL⁻¹), (■) Biosensor-genome (31.3 pg.mL⁻¹), (■) Biosensor-genome (0.62 ng.μL⁻¹), (■) Biosensor-genome (0.25 ng.μL⁻¹), (■) Biosensor-genome (0.5 ng.μL⁻¹), and (■) Biosensor-negative control, (—) the solid lines represent the simulation

results. **(c)** Equivalent circuit. **(d)** $\Delta\text{Ret}\%$ as a function of different concentrations of genomic target sequence.

Figure 5. (a) Nyquist plots of the biosensor when exposed to different concentrations of DNA genome obtained from CSF: (■) BGE, (▲) MBA-Fe₃O₄-NPs-AuNPs-DNAprobe, (◆) Biosensor-genome (0.5 pg.μL⁻¹), (×) Biosensor-genome (5.0 pg.μL⁻¹), (●) Biosensor-genome (50.0 pg.μL⁻¹), (▼) Biosensor-genome (0.5 ng.μL⁻¹). $\Delta\text{Ret}\%$ **(b)** and Θ **(c)** as function of different concentrations of *S. mansoni* genome obtained from CSF.

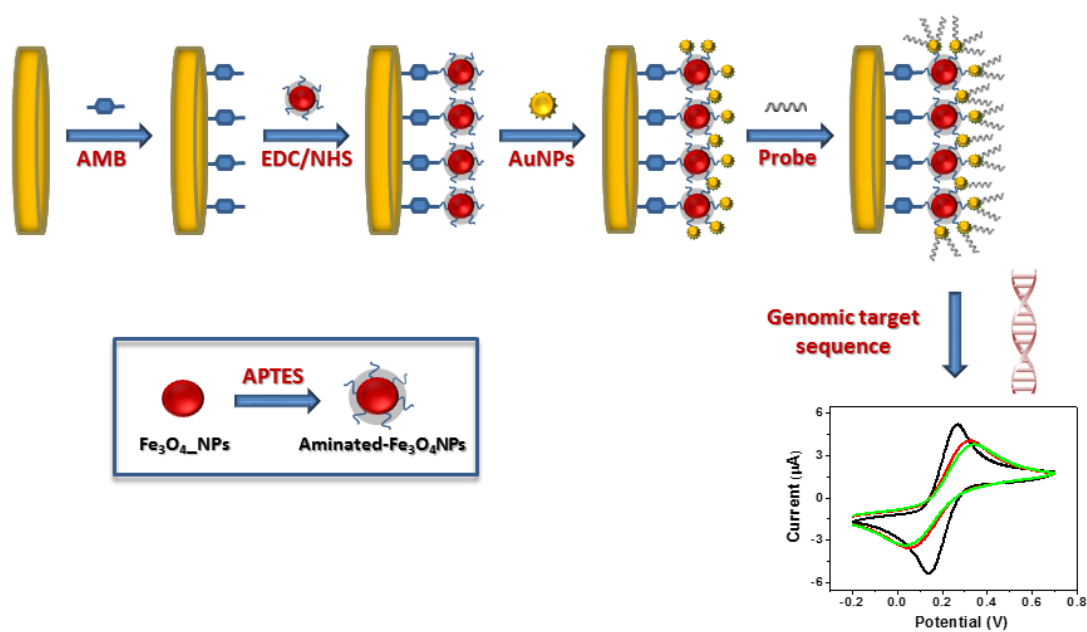


Fig.1

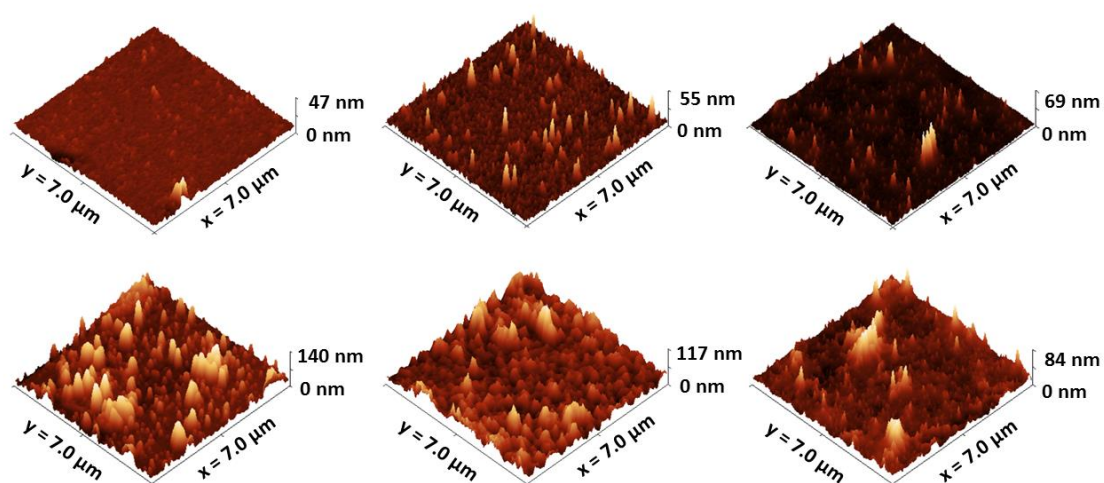


Fig. 2

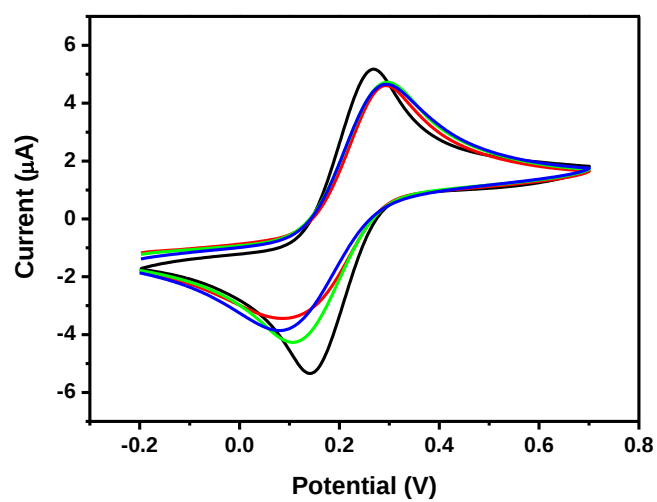


Fig.3a

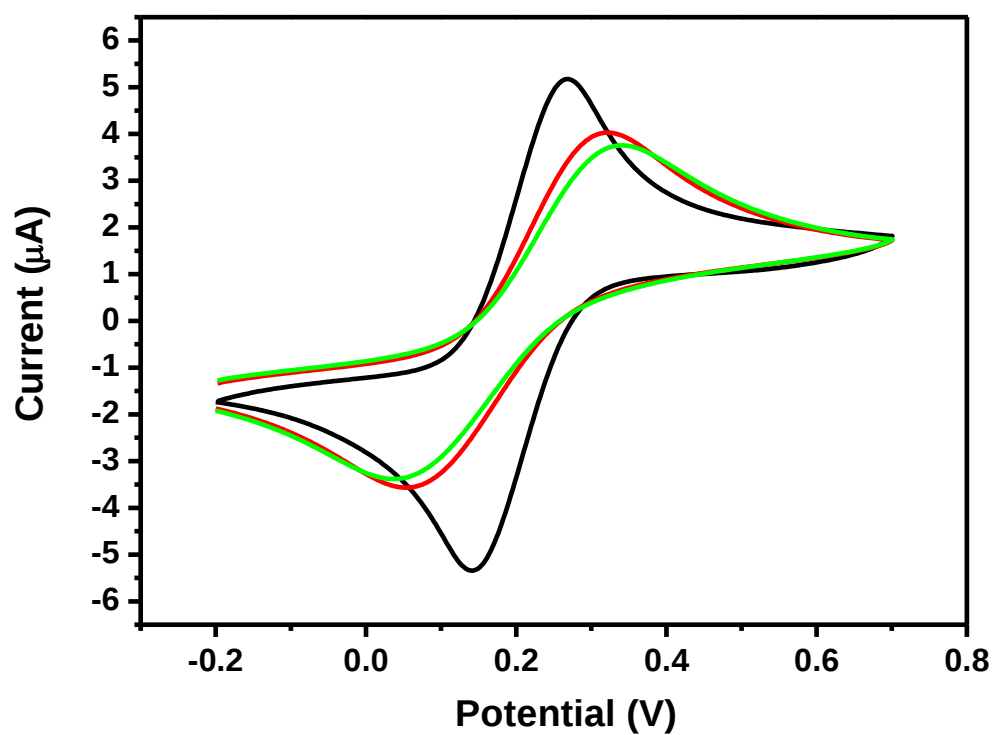


Fig. 3b

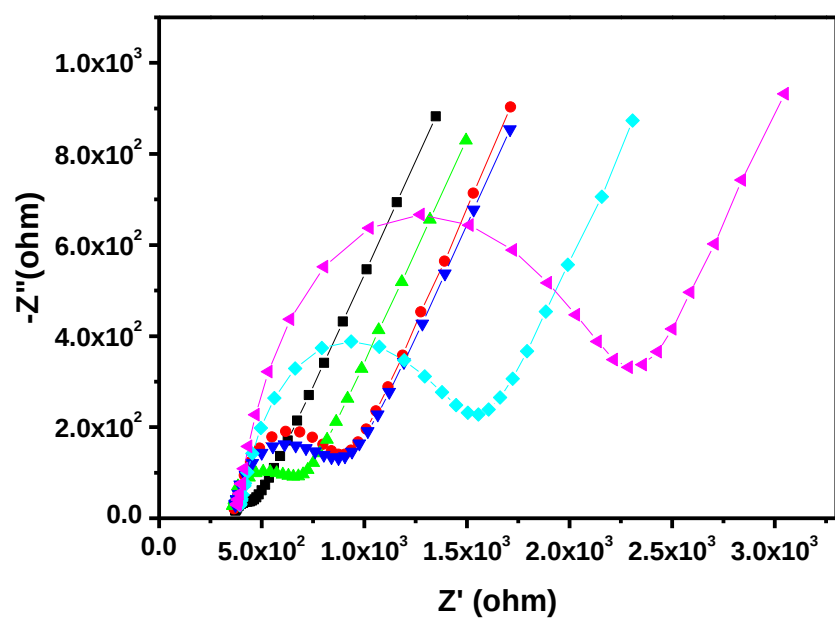


Fig. 4a

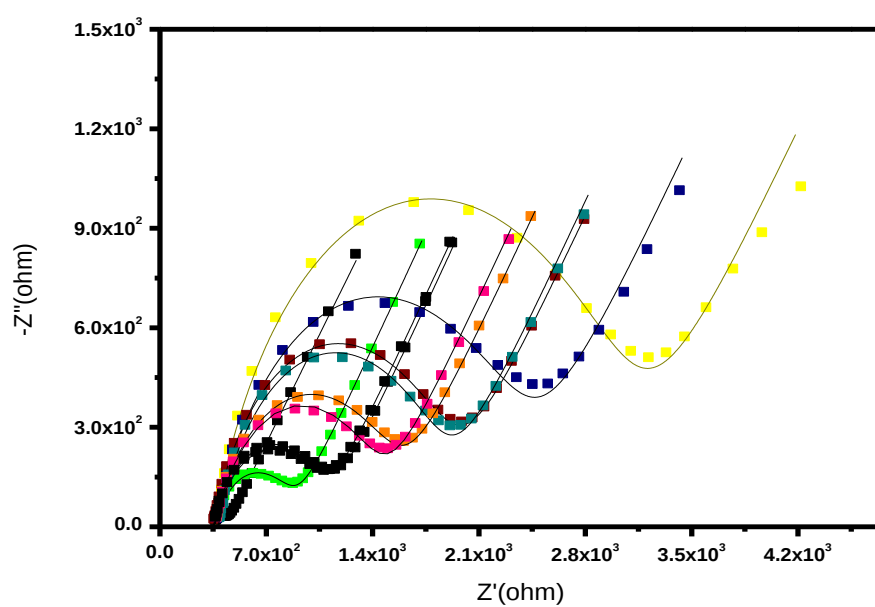


Fig. 4b

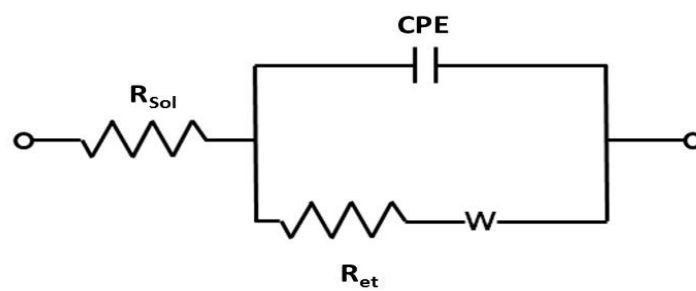


Fig. 4c

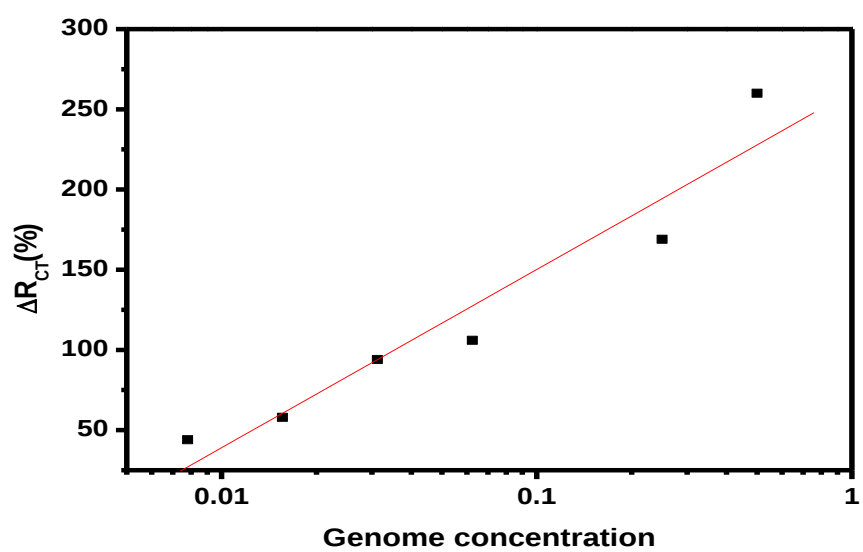


Fig. 4d

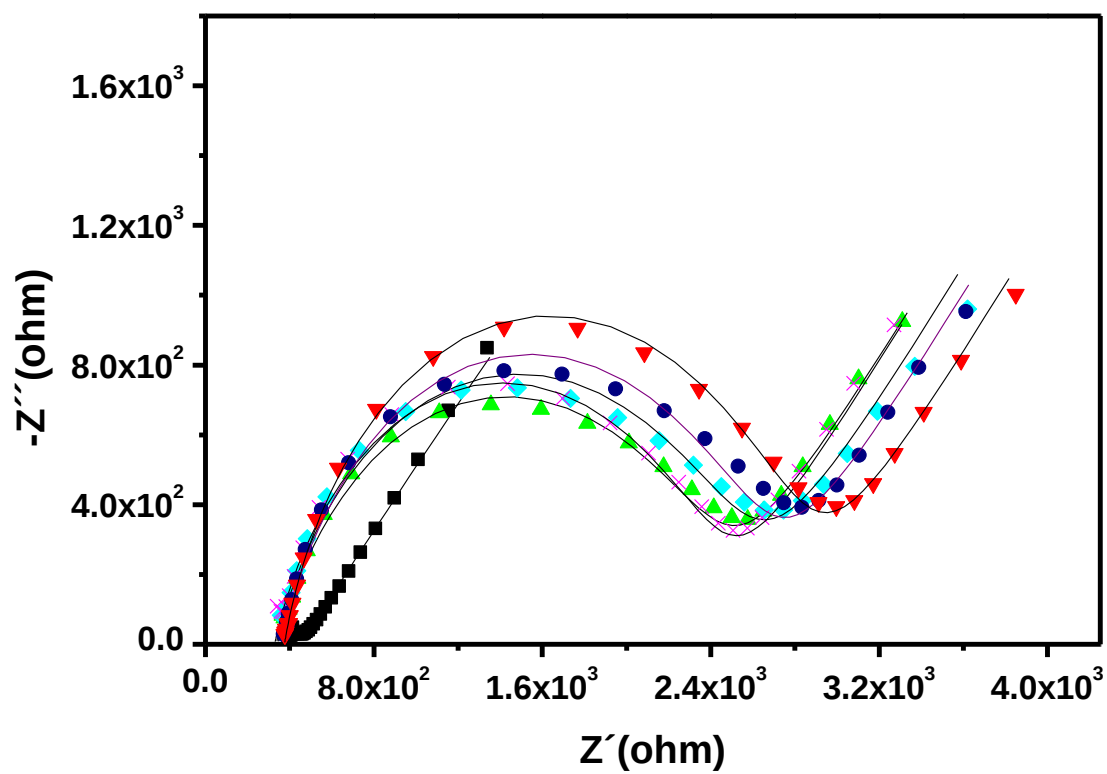


Fig. 5a

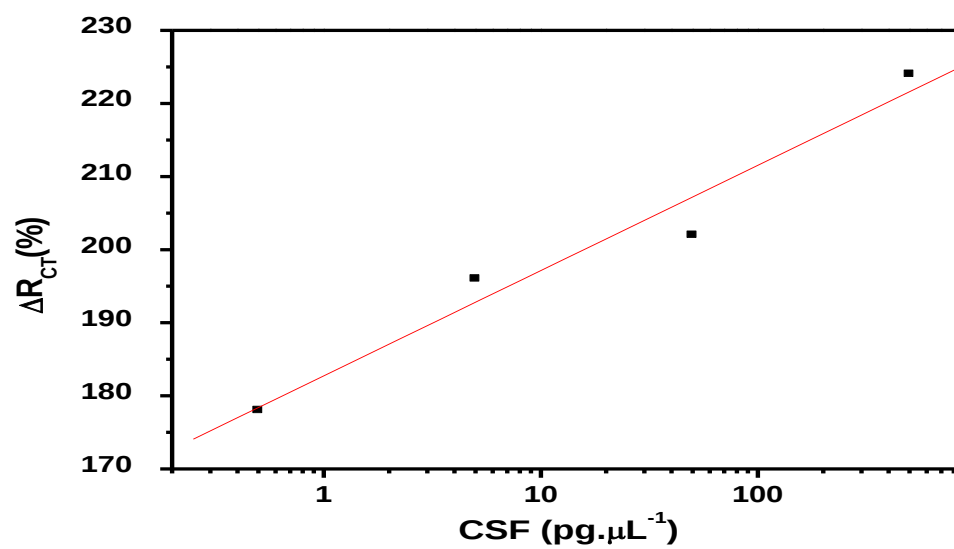


Fig. 5b

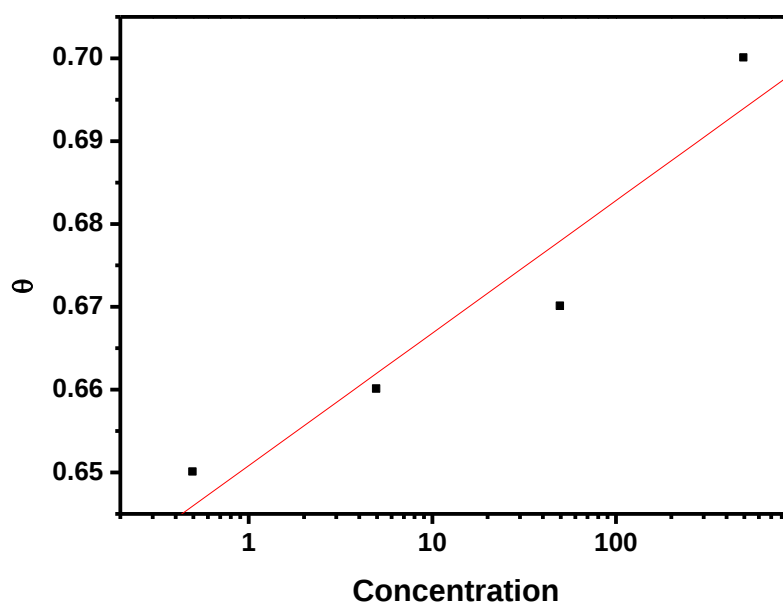


Fig. 5c

ANEXO A – Pedido de Patente

DETECÇÃO ELETROQUÍMICA DA ESQUISTOSSOMOSE UTILIZANDO
PARTÍCULAS MAGNÉTICAS DECORADAS COM PARTÍCULAS DE OURO

Pedido depositado sob o número: BR 10 2015 007805 6



< Uso exclusivo do INPI >

Espaço reservado para o protocolo

Espaço reservado para a etiqueta

Espaço reservado para o código QR



INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Sistema de Gestão da Qualidade
Diretoria de Patentes

DIRPA	Tipo de Documento: Formulário	DIRPA	Página: 1/3
Título do Documento: Depósito de Pedido de Patente		Código: FQ001	Versão: 2
		Procedimento: DIRPA-PQ006	

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:

O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas:

1. Depositante (71):

- 1.1 Nome: UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO - UFPE
1.2 Qualificação: IFES-INSTITUIÇÃO FEDERAL DE ENSINO SUPERIOR - AUTARQUIA FEDERAL
1.3 CNPJ/CPF: 24134488/0001-08
1.4 Endereço Completo: AV. PROF. MORAES REGO, 1235-CIDADE UNIVERSITÁRIA-RECIFE-PE
1.5 CEP: 50670-901
1.6 Telefone: 81-2126-8958 1.7 Fax: 81-2126-8959
1.8 E-mail: patentes_dine.propesq@ufpe.br

☐ continua em folha anexa

2. Natureza: ☒ Invenção ☐ Modelo de Utilidade ☐ Certificado de Adição

3. Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):

DETECÇÃO ELETROQUÍMICA DA ESQUISTOSSOMOSE UTILIZANDO PARTÍCULAS MAGNÉTICAS
DECORADAS COM PARTÍCULAS DE OURO

☐ continua em folha anexa

4. Pedido de Divisão: do pedido N° XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX Data de Depósito: XXXXXXXXXXXX

5. Prioridade: ☐ Interna (66) ☐ Unionista (30)

O depositante reivindica a(s) seguinte(s):

Pais ou Organização do depósito	Número do depósito (se disponível)	Data de depósito
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX

☐ continua em folha anexa

ANEXO B – Normas da Revista

SENSORS AND ACTUATORS B: CHEMICAL

An international journal devoted to research and development of chemical transducers

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

• Description	p.1
• Audience	p.2
• Impact Factor	p.2
• Abstracting and Indexing	p.2
• Editorial Board	p.2
• Guide for Authors	p.4

DESCRIPTION

Sensors & Actuators, B: Chemical is an interdisciplinary journal dedicated to covering research and development in the field of chemical sensors, actuators and microsystems.

The scope of the journal encompasses, but is not restricted to, the following areas:

- Sensing principles and mechanisms
- New materials development (transducers and sensitive/recognition components)
- Fabrication technology

AUDIENCE

Academic and Industrial Researchers in Analytical Chemistry and Instrument Development

IMPACT FACTOR

ABSTRACTING AND INDEXING

Analytical Abstracts

Cambridge Scientific Abstracts Chemical Abstracts Compendex

Computer and Control Abstracts

Current Contents Metals Abstracts EIC/Intelligence

Electrical and Electronics Abstracts Engineered Materials Abstracts Engineering Index

FIZ Karlsruhe PASCAL/CNRS Physics Abstracts

Science Citation Index

Scopus

EDITORIAL BOARD

Editors

Z. Brzozka, Warsaw University of Technology, Warsaw, Poland

Electrochemical and optical (bio) sensors and their biomedical applications, miniaturized analytical devices based on microfluidics principle, Lab-on-a-Chip devices and their applications, fabrication technology of microfluidic devices and systems, new biosensing principles.

R.E. Gyurcsányi, Budapest University of Technology and Economics, Budapest, Hungary

Electrochemical sensors (ion-selective electrodes, amperometric (bio) sensors, nanopore, ultramicroelectrodes and ion-channel mimetic sensing), Optical sensors (optodes and surface plasmon resonance biosensors), Affinity biosensors, Mass-sensitive transducers, Nano (bio) chemical sensors and sensor miniaturization, Selective synthetic receptors (nucleic acid analogs, aptamers, molecularly imprinted polymers, ionophores, etc.), Biomedical and environmental application of sensors.

J.-H. Lee, Korea University, Seoul, South Korea

1) Oxide semiconductor gas sensors - The enhancement of gas sensing characteristics by the morphological design/control of oxide nanostructures (gas sensors using oxide nanowires, nanofibers, nanopowders, nanosheets, and hierarchical nanostructures); The control of gas selectivity and response by loading or doping noble metal catalysts or oxide additives; Preparation of oxide nanostructures for gas sensor applications via the physico-chemical routes (sol-gel method, hydrothermal method, solvothermal method, thermal evaporation, sputtering, atomic layer deposition and so on); Gas sensing mechanism 2) Gas sensors using solid electrolytes, Automotive exhaust gas sensors (oxygen sensors, air-to-fuel ratio sensors, automotive hydrocarbon sensors, automotive NO_x sensors using solid electrolytes such as yttria stabilized zircona and gadolinia-doped ceria).

R. Moos, Universität Bayreuth, Bayreuth, Germany

Exhaust gas sensors, Solid state gas sensor materials, Solid state gas sensor principles, Solid state gas sensor technology and Solid state gas sensor modeling; Solid state electrochemical sensors; Conductometric or impedancemetric sensors of framework-based materials (zeolites, MOF); Transducer technology, LTCC, HTCC, hot plates; Chemical sensors for harsh environments.

R. Narayanaswamy

1) Optical Chemical sensors and Biosensors: development, applications and analytical instrumentation. New materials, devices, nano materials for optical chemical sensing, for environmental, biochemical and industrial applications; 2) Colorimetric and Fluorescence based sensing systems. Nanoparticles, molecularly imprinted polymers and other novel materials in sensors; 3) Surface Plasmon Resonance sensors and sensing systems: devices and instrumentation; 4) Mass sensitive devices, applications and instrumentation, e.g. SAW, BAW, QCM, QMB, etc.

D. Papkovsky, University College Cork, Cork, Ireland

1) Optochemical sensors; Optical Oxygen sensors; Biological applications of optical oxygen sensing and imaging; 2) Probes for chemical and biological analytes; Intracellular probes; Sensors for analysis of cellular function; 3) Nano sensors and biosensors, Fluorescence spectroscopy; Time-resolved Fluorescence, Phosphorescence Porphyrins.

G. Rivas, Universidad Nacional de Cordoba (Argentina), Córdoba, Argentina

Biosensors and biomedical applications: biomarkers sensors; enzymatic biosensors; DNA biosensors; hybridization and DNA damage biosensors; immunosensors; aptasensors. Sensing principles. Nanobiotechnology and Nanobiomedicine: nanomaterials for the development of (bio) sensors, carbon nanotubes, graphene, metallic and magnetic nanoparticles. Neurotransmitters sensors. Modified electrodes. Flow Injection Analysis.

Y. Shimizu, Nagasaki University, Nagasaki, Japan

Semiconductor gas sensors, Gas sensors by employing organic materials and/or inorganic materials, Gas sensing principle mechanism, New gas sensor materials, Humidity sensors.

M. Tokeshi, Hokkaido University, Sapporo, Japan

Lab-on-a-Chip, MicroTAS, Biochip and Biosensor, Microfabrication and Nanofabrication, Biomedical

Applications, Bioanalytical Chemistry, Highly sensitive Detection Methods.

U. Weimar, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Tübingen, Germany

Chemical sensor systems, data processing of chemical sensor systems, related pattern recognition and multi-component analysis, electronic noses, application of chemical sensor systems.

GUIDE FOR AUTHORS

Aims and Scope

Sensors & Actuators, B: Chemical is an interdisciplinary journal dedicated to covering research and development in the field of chemical sensors, actuators, micro- and nanosystems.

The scope of the journal encompasses, but is not restricted to, the following areas:

- Sensing principles and mechanisms
 - New materials development (transducers and sensitive/recognition components)
 - Fabrication technology including nanotechnology
 - Actuators
 - Optical devices
 - Electrochemical devices
 - Mass-sensitive devices
 - Gas sensors
 - Biosensors
 - Bio-MEMS
 - Analytical microsystems
 - Environmental
 - Process control
 - Biomedical applications
 - Signal processing
 - Sensor and sensor-array chemometrics
- μ TAS - Micro Total Analysis Systems
Microsystems for the generation, handling and analysis of (bio)chemical information.
The special section of Sensors & Actuators, B: Chemical on μ TAS is dedicated to contributions concerning miniaturised systems for (bio)chemical synthesis and analysis, also comprising work on Bio-MEMS, Lab-on-a-chip, biochips and microfluidics.

Topics covered by the μ TAS section include:

- Lab-on-a-chip
- Physics and chemistry of microfluidics
- Microfabrication technology for μ TAS
- Analytical chemical aspects
- Detectors, sensors, arrays for μ TAS
- μ TAS applications
- DNA analysis
- Microinstrumentation
- Microsystems for combinatorial chemistry

Types of paper

Sensors and Actuators B: Chemical, welcomes full length research papers and review articles, and short communications. Full length papers should in general not exceed 5000 words or about 12 printed pages including tables and diagrams. Short communications should not exceed 2000 words or 4 printed pages. For all contributions the acceptance criteria are quality, originality, and scientific and technological relevance to the field. An adequate referencing to the state-of-the-art is essential.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <https://www.elsevier.com/publishingethics> and <https://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or

organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <https://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: http://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/supporthub/publishing.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <https://www.elsevier.com/sharingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck <https://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors before submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only before the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the corresponding author: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors after the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript

has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Article transfer service

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. More information about this can be found here: <https://www.elsevier.com/authors/article-transfer-service>.

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <https://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <https://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <https://www.elsevier.com/permissions>.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <https://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <https://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. For more information see <https://www.elsevier.com/copyright>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some authors may also be reimbursed for associated publication fees. To learn more about existing agreements please visit <https://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf e.g. by their research funder or institution

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our universal access programs (<https://www.elsevier.com/access>).
- No open access publication fee payable by authors.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution (CC BY)

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is USD 3100, excluding taxes. Learn more about

Elsevier's pricing policy: <https://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our green open access page for further information (<http://elsevier.com/greenopenaccess>). Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications.

Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form.

This journal has an embargo period of 24 months.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>) or visit our customer support site (<http://support.elsevier.com>) for more information.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Please submit your article via <http://www.elsevier.com/locate/snb>

Referees

Authors are required to submit the names, addresses and e-mail addresses of five potential reviewers who could objectively review their manuscripts if asked to do so by the journal editors. The editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used. Please note that if no reviewer names are submitted, publication of your manuscript may be delayed.

PREPARATION

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <https://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered

1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Vitae

Include in the manuscript a short (maximum 100 words) biography of each author.

Essential title page information

- Title. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- Author names and affiliations. Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower- case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- Corresponding author. Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.
- Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate

editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum

85 characters, including spaces, per bullet point). See <https://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y . In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by $\exp$. Number

consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork	Electronic	artwork	General	points
---------	------------	---------	---------	--------

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi. TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of

500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Non-electronic artwork

Provide all illustrations as high-quality printouts, suitable for reproduction (which may include reduction) without retouching. Number illustrations consecutively in the order in which they are referred to in the text. They should accompany the manuscript, but should not be included within the text. Clearly mark all illustrations on the back (or - in

case of line drawings - on the lower front side) with the figure number and the author's name and, in cases of ambiguity, the correct orientation. Mark the appropriate position of a figure in the article.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for color: in print or online only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or

'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles (<http://citationstyles.org>), such as Mendeley (<http://www.mendeley.com/features/reference-manager>) and Zotero (<https://www.zotero.org/>), as well as EndNote (<http://endnote.com/downloads/styles>). Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/sensors-and-actuators-b-chemical>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

Example: '..... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result'

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, J. Sci. Commun.

163 (2010) 51–59. Reference to a book:

[2] W. Strunk Jr., E.B. White, The Elements of Style, fourth ed., Longman, New York, 2000. Reference to a chapter in an edited book:

[3] G.R. Mettam, L.B. Adams, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), Introduction to the Electronic Age, E-Publishing Inc., New York, 2009, pp. 281–304. Reference to a website:

[4] Cancer Research UK, Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/>

[aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/](http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/), 2003 (accessed 13.03.03).

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations:

<http://www.issn.org/services/online-services/access-to-the-ltwa/>.

AUTHOR INQUIRIES

You can track your submitted article at <https://www.elsevier.com/track-submission>. You can track your accepted article at <https://www.elsevier.com/trackarticle>. You are also welcome to contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.