



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE BIOCIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS- GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

GISELLE SOARES DOS SANTOS

**DESENVOLVIMENTO DE NANOBIOELETRODOS BASEADOS EM
NANOESTRUTURAS DE OURO PARA O GENODIAGNOSTICO DA
ESQUISTOSSOMOSE E DA LEISHMANIOSE**

Recife

2019

GISELLE SOARES DOS SANTOS

**DESENVOLVIMENTO DE NANOBIOELETRODOS BASEADOS EM
NANOESTRUTURAS DE OURO PARA O GENODIAGNOSTICO DA
ESQUISTOSSOMOSE E DA LEISHMANIOSE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Bioquímica e Fisiologia.

Área de concentração: Bioquímica e Fisiologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Danielly Lima de Oliveira

Coorientadores: Prof^o. Dr. Cesar Augusto Souza de Andrade
Prof^o. Dr. Fábio Lopes de Melo

Recife
2019

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Santos, Giselle Soares dos
Desenvolvimento de nanobioeletrodos baseados em
nanoestruturas de ouro para o genodiagnóstico da esquistossomose e
da leishmaniose / Giselle Soares dos Santos - 2019.
220 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Maria Danielly Lima de Oliveira
Coorientadores: Cesar Augusto Souza de Andrade
Fábio Lopes de Melo

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro
de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e
Fisiologia. Recife, 2019.

Inclui referências e apêndice.

1. Biossensores 2. Esquistossomose 3. Leishmaniose
I. Oliveira, Maria Danielly Lima de (Orientadora) II. Andrade, Cesar
Augusto Souza de (Coorientador) III. Melo, Fábio Lopes de
(Coorientador) IV. Título

616.9364 CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2020-168

GISELLE SOARES DOS SANTOS

**DESENVOLVIMENTO DE NANOBIOELETRODOS BASEADOS EM
NANOESTRUTURAS DE OURO PARA O GENODIAGNOSTICO DA
ESQUISTOSSOMOSE E DA LEISHMANIOSE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Bioquímica e Fisiologia.

Aprovada em: 11/12/2019

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dr^a Maria Danielly Lima de Oliveira (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. César Augusto Souza de Andrade (Examinador interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Fábio Lopes de Melo (Examinador Externo)
Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães

Prof. Dr. Kléber Gonçalves Bezerra (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Isaac Aarón Morales Frias (Examinador interno)
Universidade Federal de Pernambuco

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

Quero agradecer a Deus a quem acredito e confio por me permitir chegar até aqui, me dando forças e saúde para superar as dificuldades e por conceder-me incontáveis bênçãos.

Aos meus pais Cícero e Marli, pela luta e dedicação durante a vida, pelos valores que me ensinaram, pelo apoio e confiança.

Ao meu esposo e amigo Romero Bomfim por ser tão importante na minha vida. Sempre ao meu lado, me pondo para cima e me fazendo acreditar que posso mais do que imagino, obrigada por todo carinho e ajuda.

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 coorientador Prof. Dr. Cesar Augusto Souza de Andrade, agradeço também pela oportunidade, apoio, suporte e por me proporcionar conhecimento inestimável nessa área.

Ao meu coorientador Dr. Fábio Lopes de Melo por estar sempre disponível a me ajudar, pelos direcionamentos, pelas palavras de incentivo e claro pelo material cedido para que este trabalho pudesse ser desenvolvido.

As minhas amadas amigas Flávia, Maurília e Karen por todo apoio, pelas palavras de incentivo, por fazer a caminhada mais leve e divertida, amo muito vocês. E em especial a minha amiga Kalline, por me ouvir e me aconselhar nos momentos de angústia, por dividir as

alegrias e os momentos de descontração. Aos poucos nos tornamos mais que amigas quase irmãs. Foi bom poder contar com vocês.

Agradeço a todos do Laboratório de Biodispositivos Nanoestruturados (BIONANO), os quais além da amizade me ajudaram muito nos momentos que necessitei.

Aos docentes e funcionários do Programa de Pós Graduação em Bioquímica e Fisiologia.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica.

A CAPES 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.

"Foi o tempo que dedicastes à tua rosa que a fez tão importante"

(Antoine de Saint-Exupéry)

RESUMO

Esquistossomose mansonica e Leishmaniose chagasi são importantes parasitoses responsáveis por altas taxas de morbidade e mortalidade em todo Brasil. O diagnóstico precoce é de fundamental importância para eficiência do tratamento e controle destas enfermidades. Reação em cadeia de polimerase (PCR), ELISA, parasitológico de fezes e exame direto são os métodos clínicos utilizados atualmente para a determinação destas infecções. A confirmação do diagnóstico por estas técnicas, no entanto, não são satisfatoriamente sensíveis e/ou específicas, apresentando limitações que precisam e podem ser superadas por meio do desenvolvimento de novas técnicas de detecção. Diante disto, neste trabalho, foram desenvolvidas plataformas sensoras baseadas em eletrodeposição direta de nanopartículas de ouro sobre superfícies previamente modificadas com mercaptopropiltrimetoxisilano para a detecção eletroquímica de DNA de *Schistosoma mansoni* e *Leishmania chagasi*. As técnicas de Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) e de voltametria cíclica (CV) foram utilizadas para monitorar os eventos de bioreconhecimento dos sistemas desenvolvidos. O biossensor proposto para reconhecimento de DNA de *Schistosoma* foi capaz de reconhecer sequências de nucleotídeos específica de *S. mansoni* presente em amostras de soro (27 pg μL^{-1} a 42 pg μL^{-1}), urina (27 pg μL^{-1} a 50 pg μL^{-1}) e líquido cefalorraquidiano (25 pg μL^{-1} a 60 pg μL^{-1}) e o biossensor proposto para reconhecimento de DNA de *L. chagasi* foi eficiente na detecção em amostras de soro (1 pg μL^{-1} a 1 ng μL^{-1}) desta forma, podemos inferir que os genossensores desenvolvidos mostraram-se eficientes em todas as medições. Os resultados de bioreconhecimento foram comprovados pelo aumento na resistência de transferência de cargas e pela diminuição dos picos de corrente proporcionais às concentrações de DNA durante as análises eletroquímicas. As plataformas desenvolvidas mostraram limite de detecção de 0,6 pg. μL^{-1} e 1pg. μL^{-1} para detecção do *S. mansoni* e *L. chagasi* respectivamente. Portanto, o biossensor obtido pode ser considerado como um instrumento útil para a detecção específica de DNA destes parasitas em baixas concentrações e em diferentes fluidos biológicos.

PALAVRAS CHAVE: Biossensores. Esquistossomose. Leishmaniose. Eletrodeposição. Nanopartículas.

ABSTRACT

Schistosomiasis mansonica and Leishmaniasis chagasi are important parasites responsible for high rates of morbidity and mortality throughout Brazil. Early diagnosis is of fundamental importance for efficient treatment and control of these diseases. Polymerase chain reaction (PCR), ELISA, parasitological stool and direct examination are the clinical methods currently used to determine these infections. The confirmation of the diagnosis by these techniques, however, is not satisfactorily sensitive and / or specific, presenting limitations that need and can be overcome through the development of new detection techniques. In view of this, in this work, sensor platforms were developed based on direct electrodeposition of gold nanoparticles on surfaces previously modified with mercaptopropyltrimethoxysilane for the electrochemical detection of DNA from *Schistosoma mansoni* and *Leishmania chagasi*. Electrochemical impedance spectroscopy (EIE) and cyclic voltammetry (CV) techniques were used to monitor the biorecognition events of the developed systems. The proposed biosystem for Schistosoma DNA recognition was able to recognize *S. mansoni* specific nucleotide sequences present in serum samples (27 pg μL^{-1} to 42 pg μL^{-1}), urine (27 pg μL^{-1} at 50 pg μL^{-1}) and cerebrospinal fluid (25 pg μL^{-1} at 60 pg μL^{-1}) and the proposed biosystem for recognition of *L. chagasi* DNA was efficient in the detection in serum samples (1 pg μL^{-1} to 1 ng μL^{-1}) In this way, we can infer that the developed genosensors proved to be efficient in all measurements. The results of biorecognition were confirmed by the increase in charge transfer resistance and the decrease in current peaks proportional to DNA concentrations during electrochemical analyzes. The developed platforms showed a detection limit of 0.6 pg μL^{-1} and 1 pg μL^{-1} for detection of *S. mansoni* and *L. chagasi* respectively. Therefore, the obtained biosensor can be considered as a useful instrument for the specific detection of DNA of these parasites in low concentrations and in different biological fluids.

KEYWORDS: Biosensors. Schistosomiasis. Leishmaniasis. Electrodeposition. Nanoparticles.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 — Ciclo biológico do <i>Schistosoma mansoni</i>	24
Figura 2 — Distribuição da esquistossomose, de acordo com o percentual de positividade por município no Brasil no período de 2010 a 2015.....	26
Figura 3 — Paciente com a forma hepatoesplênica da esquistossomose <i>mansoni</i>	28
Figura 4 — Manifestação cutânea da esquistossomose.....	29
Figura 5 — Alargamento do cone medular e captação homogênea e circunscrita de contraste em medula torácica baixa em paciente com mielopatia esquistossomótica.....	30
Figura 6 — Formas da <i>Leishmania chagasi</i> . a) forma flagelada promastigota; b) forma aflagelada amastigota.....	37
Figura 7 — ciclo biológico da <i>Leishmania sp.</i> no hospedeiro invertebrado e mamífero.....	38
Figura 8 — Número de óbitos por leishmaniose visceral e taxa de letalidade, segundo ano de notificação em Pernambuco de 2005 a 2014.....	39
Figura 9 — Leishmaniose Tegumentar Americana: a) forma cutânea. b) forma mucocutânea.....	40
Figura 10 — Paciente com Leishmaniose visceral.....	41
Figura 11 — Representação esquemática de um biossensor.....	47

Figura 12 — Eletrodo de referência, de trabalho e auxiliar e célula eletroquímica convencional de três eletrodos.....	50
Figura 13 — Esquema de um genossensor.....	52
Figura 14 — Versatilidade sintética das nanopartículas de Ouro.....	57
Figura 15 — Algumas aplicações biomédicas das nanopartículas de ouro.....	59
Figura 16 — Representação esquemática das etapas de formação de depósitos na superfície de um eletrodo.....	62
Figura 17 — Representação esquemática de uma monocamada automontada mostrando a modificação de uma superfície de ouro com alcanotiol e sua estrutura unitária molecular.....	64
Figura 18 — Representação esquemática de uma Célula eletroquímica contendo uma solução eletrolítica e um conjunto de eletrodos conectados a um potenciostato/galvanostato.....	65
Figura 19 — Voltamogramas cíclicos de uma solução e com diferentes concentrações de DNA _{alvo} em eletrodos de ouro.....	67
Figura 20 — 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 e (Ei) potencial de inversão.....	68
Figura 21 — Diferentes reversibilidades de sistemas avaliados por voltametria cíclica: sistema reversível, quasireversível e irreversível.....	69
Figura 22 — Representação de uma onda senoidal de período t_p e amplitude I_p e sua relação entre a representação do correspondente vetor de comprimento I_p	

girando em sentido anti-horário a uma velocidade angular constante de $\Omega=2\pi f$ radianos/segundo ou uma frequência de f Hz.....72

Figura 23 — Resposta senoidal de corrente elétrica frente à uma perturbação de potencial.....73

Figura 24 — Representação da impedância complexa em função da frequência no (a) plano complexo, e em (b) magnitude e fase.....73

Figura 25 — Representação esquemática de um diagrama de nyquist.....74

Figura 26 — Circuito equivalente de Randles para uma interface eletrodo/solução.....75

Figura 27 — Esquema de funcionamento do AFM.....78

Figura 28 — **a)** Comportamento qualitativo da dependência do potencial da força interatômica com a distância entre a ponta de prova e a superfície da amostra. **b)** Imagem obtida via AFM.....80

Figura 29 — Etapas de montagem da plataforma sensora..... 85

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

NPsAu	Nanopartículas de ouro
Cdl	Capacitância da dupla camada
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês <i>desoxyribonucleic acid</i>)
E	Potencial
EIE	Espectroscopia de Impedância Eletroquímica
Ipa	Corrente de pico anódica
Ipc	Corrente de pico catódica
Epa	Potencial de pico anódico
Epc	Potencial de pico catódico
SAM	Camadas automontadas (do inglês <i>Self- assembled monolayers</i>)
MPTS	Mercaptopropiltrimetoxisilano
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LOD	Limite de detecção
NE	Neuroesquistossomose mansônica
PCR	Reação em cadeia da Polimerase (do inglês <i>polymerase chain reaction</i>)
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase – transcriptase reversa (do inglês <i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>)
RIFI	Reação de imunofluorescência indireta
Rct	Resistência à transferência de carga
ELISA	(do inglês <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
$\Delta Rct\%$	Variação de percentual relativo da variação à transferência de carga

$R\Omega$	Resistência ôhmica
AFM	Microscopia de força atômica (do inglês <i>atomic-force microscopy</i>)
VC	Voltametria cíclica
Z	Impedância
Z_f	Impedância faradáica
Z_{im}	Parte Imaginária ou componente capacitiva
Z_{re}	Parte Real ou componente resistiva
ZW ou W	Impedância de Warburg

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	21
1.2.1	Doenças Negligenciadas	21
1.2.2	Esquistossomose.....	22
1.2.3	Leishmaniose.....	36
1.2.4	Biossensores.....	46
1.2.5	Nanopartículas de Ouro	56
1.2.6	Modificação da Superfície do Transdutor	60
1.2.7	Técnicas Eletroanalíticas	64
1.2.8	Microscopia de Força Atômica.....	77
1.3	OBJETIVOS.....	82
1.3.1	Objetivo Geral	82
1.3.2	Objetivos Específicos.....	82
2	METODOLOGIA.....	83
2.1	MATERIAIS	83
2.2	PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	83
2.3	MODIFICAÇÃO DO ELETRODO COM MPTS E ELETRODEPOSIÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO	84
2.4	MODIFICAÇÃO DO ELETRODO	85
2.5	ANÁLISE DE HIBRIDIZAÇÃO.....	86
2.6	MEDIDAS ELETROQUÍMICAS.....	86
2.7	MEDIÇÕES DE MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA.....	86
3	RESULTADOS	88
3.1	ARTIGO I — LABEL-FREE NANOSTRUCTURED BIOSENSOR FOR SCHISTOSOMA MANSONI DETECTION IN COMPLEX BIOLOGICAL FLUIDS	88
3.2	ARTIGO II — GOLD NANOPARTICLE-BASED NUCLEIC ACID BIOSENSOR FOR RAPID DETECTION OF LEISHMANIA INFANTUM.....	96
3.3	PATENTE I — PLATAFORMA DE OURO ELETRODEPOSITADO PARA DETECÇÃO DO GENOMA DO VERME DE <i>SCHISTOSOMA MANSONI</i>	113

3.4 PATENTE II — MÉTODO DE BIODETECCÃO ELETROQUÍMICA DO GENOMA DE LEISHMANIA UTILIZANDO NANOPARTÍCULAS METÁLICAS DE ÓXIDO DE ZINCO.....	133
4 CONCLUSÃO.....	156
REFERENCIAS	157
APÊNDICE A — BIOSENSORS A NEW LOOK FOR THE DIAGNOSIS OF SCHISTOSOMIASIS – A MINI-REVIEW	225

1 INTRODUÇÃO

A alta prevalência da esquistossomose e da leishmaniose pode ser explicada pela mudança da área de ocorrência devido às modificações provocadas pelo homem, da migração da população de áreas endêmicas para outros locais e pela falta de acesso e/ou condições precárias de saneamento básico (Brasil, 2010).

A esquistossomose mansônica é uma doença parasitária, de evolução crônica, cuja magnitude da prevalência, severidade das formas clínicas e evolução a caracterizam como um importante problema de saúde pública no país, onde se estima que aproximadamente 1,5 milhão de pessoas estejam infectadas pelo *Schistosoma mansoni* (Brasil, 2017). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a esquistossomose afeta quase 240 milhões de pessoas em todo o mundo e mais de 700 milhões de pessoas vivem em áreas endêmicas. A infecção prevalece em áreas tropicais e subtropicais, em comunidades pobres sem água potável e saneamento adequado (WHO, 2018; Brasil, 2014). A esquistossomose possui baixa letalidade e as principais causas de óbito estão relacionadas às formas clínicas graves. Entre 2006 e 2015, registraram-se, em média, cerca de 510 óbitos anuais pela doença no país (Brasil, 2017). 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).

Dentre as formas ectópicas da doença destacamos a neuroesquistossomose que pode ser definida como o comprometimento de forma sintomática ou assintomática do sistema nervoso pelos esquistossomos. Embora possa comprometer qualquer parte do sistema nervoso central geralmente se considera apenas dois tipos de neuroesquistossomose: a encefálica e a mielorradiculopatia (Ferrari; Drummond; Reis, 2008). Afetando a medula espinhal com maior frequência do que o cérebro (Ferrari; Moreira; Cunha, 2008). Quase todos os casos relatados de neuroesquistossomose são causados por infecção por *S. mansoni*, *S. haematobium* ou *S. japonicum*. Embora rara em comparação com a alta prevalência da doença hepatointestinal e do trato urinário, a neuroesquistossomose não é incomum e provavelmente é pouco reconhecida (Ferrari; Moreira, 2011).

Por outro lado, as leishmanioses também são consideradas um grande problema de saúde pública e representam um conjunto de doenças com importante espectro clínico e diversidade epidemiológica. A OMS estima que 350 milhões de pessoas estejam expostas ao risco de infecção e que ocorram aproximadamente 1,5 a 2 milhões de novos casos das diferentes formas clínicas ao ano. No mundo, cerca de 15 milhões de pessoas estão infectadas. Américas, África, Ásia e sul da Europa são consideradas regiões endêmicas (Brasil, 2006a, 2007). Nas Américas a Leishmaniose visceral já foi descrita em pelo menos 12 países, sendo que 96% dos casos foram reportados pelo Brasil (OPAS, 2019). No país, o Ministério da Saúde estima que quase três mil pessoas sejam infectadas anualmente (Brasil, 2017).

Tanto a esquistossomose quanto a leishmaniose ocorrem de forma endêmica em vários estados brasileiros, incluindo Pernambuco. Além do adoecimento, o risco de óbito ocasionado por estes agravos é bastante relevante. Desta forma, o combate a estas doenças foi incluso no Programa de Enfrentamento às Doenças Negligenciadas – SANAR (Pernambuco, 2015). Que objetiva o desenvolvimento de um conjunto articulado de ações de promoção, prevenção e controle destas patologias. Assim, o desenvolvimento de novas metodologias diagnósticas para a esquistossomose e a leishmaniose visa contribuir com a estratégia de controle destas patologias.

Um grande número de parcerias, programas, organizações e iniciativas de saúde global (governamentais ou não), foram criados nas últimas duas décadas para acelerar o desenvolvimento científico-tecnológico e encontrar soluções para os problemas de saúde dos países de baixa e média renda, visando à criação de várias parcerias público-privadas para o desenvolvimento e acesso a novos produtos e intervenções para doenças infecciosas negligenciadas (Zicker et al., 2019). O relatório G-Finder (2018) do projeto Policy Cures Research, principal referência para o monitoramento de recursos para Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) em doenças negligenciadas, identificou 197 organizações, incluindo 10 agências brasileiras, envolvidas no fomento de P&D para Doenças tropicais negligenciadas (DTNs) (G-FINDER, 2018). Embora existam financiamentos para pesquisas relacionadas às doenças negligenciadas, recentemente, o montante de financiamento brasileiro para a infraestrutura de ciência e pesquisa foi fortemente reduzido pela crise econômica. O financiamento público para Ciência Tecnologia e Inovação (CT&I) tem sido uma das primeiras linhas orçamentárias a ser afetada quando há pressão fiscal (Zicker, Cuervo &

Salicrup, 2018). Além disto, muitas vezes a produção científica produzida não se reverte em avanços terapêuticos, como, por exemplo, novos fármacos, métodos diagnósticos e vacinas, o que sugere a não aplicação de novos conhecimentos na solução de problemas de saúde pública. Uma das razões para esse quadro é o baixo interesse da indústria farmacêutica nesse tema, justificado pelo reduzido potencial de retorno lucrativo para a indústria, uma vez que a população atingida é de baixa renda e presente, em sua maioria, nos países em desenvolvimento (Garcia et al., 2011).

Os biossensores apresentam-se como importantes ferramentas alternativas para complementar as técnicas de diagnóstico da leishmaniose e esquistossomose normalmente utilizadas (ELISA, PCR e RIFI) graças às suas características, 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 (Rosatto 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).

O desenvolvimento de biossensores eletroquímicos de DNA tem atraído esforços de investigação consideráveis nos últimos anos (Palecek, 2009). Com o surgimento 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, aprimorando seu limite de detecção e sua especificidade, 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, por exemplo, entre a adsorção da amostra e obtenção dos resultados, especialmente quando tais dispositivos são combinados com os nanomateriais (Suárez et al., 2013). Dentre os nanomateriais as nanopartículas de ouro se destacam, pois 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 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).

A Declaração da América Latina e Caribe para a sexta edição do Fórum Mundial da Ciência (Declaração, 2013), com a intenção de tornar o tema menos negligenciado pela ciência, estabeleceu em seu conteúdo que o conhecimento científico deve ser utilizado para a promoção da inclusão social, promoção do bem estar e redução da pobreza. Sendo assim, as pesquisas sobre as doenças negligenciadas devem ser fomentadas. Neste sentido, o desenvolvimento de genossensores impedimétricos para detecção de *Schistosoma* e *Leishmania* em diferentes fluidos biológicos é de fundamental importância, pois possibilita o diagnóstico precoce destas doenças e consequentemente a diminuição de sua evolução para as formas mais graves, contribuindo assim para alcançar estes objetivos.

1.2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.2.1 Doenças Negligenciadas

As Doenças Negligenciadas (DNs) também denominadas de doenças tropicais negligenciadas (DTNs) apresentam alta incidência em países de clima tropical. Sua ocorrência diretamente relacionada à situação econômica desfavorável e ao baixo desenvolvimento social (Camargo, 2008). Pois elas não só prevalecem em condições de pobreza, mas também, contribuem para a manutenção do quadro de desigualdade, já que representam um forte entrave ao desenvolvimento dos países. Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), mais de um bilhão de pessoas estão infectadas com uma ou mais doenças negligenciadas, o que representa um sexto da população mundial (Brasil, 2010b).

Em 2005 o Ministério da Saúde do Brasil lançou um programa de pesquisa e desenvolvimento em doenças negligenciadas que incluía seis doenças: dengue, doença de Chagas, leishmanioses, hanseníase, malária e tuberculose. No ano de 2008, foi adicionada a esquistossomose na lista das doenças negligenciadas (Morel et al, 2009). Posteriormente, em 2017 o Ministério da Saúde lista as seguintes doenças como negligenciadas: doença de Chagas, esquistossomose mansoni, hanseníase, filariose linfática, leishmaniose tegumentar, leishmaniose visceral, oncocercose, raiva humana, tracoma (Brasil, 2018). Embora existam inegáveis avanços nos esforços visando à diminuição da ocorrência destas patologias, verifica-se no Brasil que doenças relacionadas à pobreza ainda são encaradas como um problema persistente de saúde pública (Barreto et al., 2011). A liderança ocupada no ranking mundial para casos registrados de leishmaniose visceral com 90% dos casos mundiais é um exemplo disto.

Apesar de existirem outras doenças incluídas nesta classificação, neste trabalho abordaremos apenas as principais características das doenças tropicais negligenciadas Esquistossomose (com ênfase na neuroesquistossomose) e Leishmaniose.

1.2.2 Esquistossomose

É uma doença tropical negligenciada debilitante, em termos de mortalidade é considerada uma das mais graves infecções parasitárias do mundo (Radwa et al., 2014). No Brasil, cerca de 25 milhões de pessoas vivem em áreas endêmicas e ainda 4 a 6 milhões estão infectadas, o predomínio de áreas endêmicas está situada 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 vetores da doença (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, 2009).

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; Amaral, 2004; Jesus, 2004; Lambertuci, 2005). A carga parasitária, por sua vez, é influenciada pelo grau de contato com a água, reflexo das condições socioeconômicas e culturais da população (Rollemberg, 2008).

O envolvimento do sistema nervoso central (SNC) na esquistossomose pode ou não determinar manifestações clínicas. Quando sintomática, a neuroesquistossomose (NE) é uma das formas mais graves de apresentação da infecção esquistossomótica (Ferrari; Moreira; Cunha, 2008). O comprometimento do sistema nervoso pode ocorrer diretamente pelo parasita ou indiretamente pela deposição de complexos imunes circundantes, sendo a forma ectópica a mais frequente e incapacitante da infecção esquistossômica (Andrade Filho et al., 2015). 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 NE não é pouco frequente e é provavelmente sub-reconhecida (Chen et al., 2006), portanto a sua real prevalência é desconhecida.

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).

1.2.2.1 Ciclo Biológico do *Schistosoma mansoni*

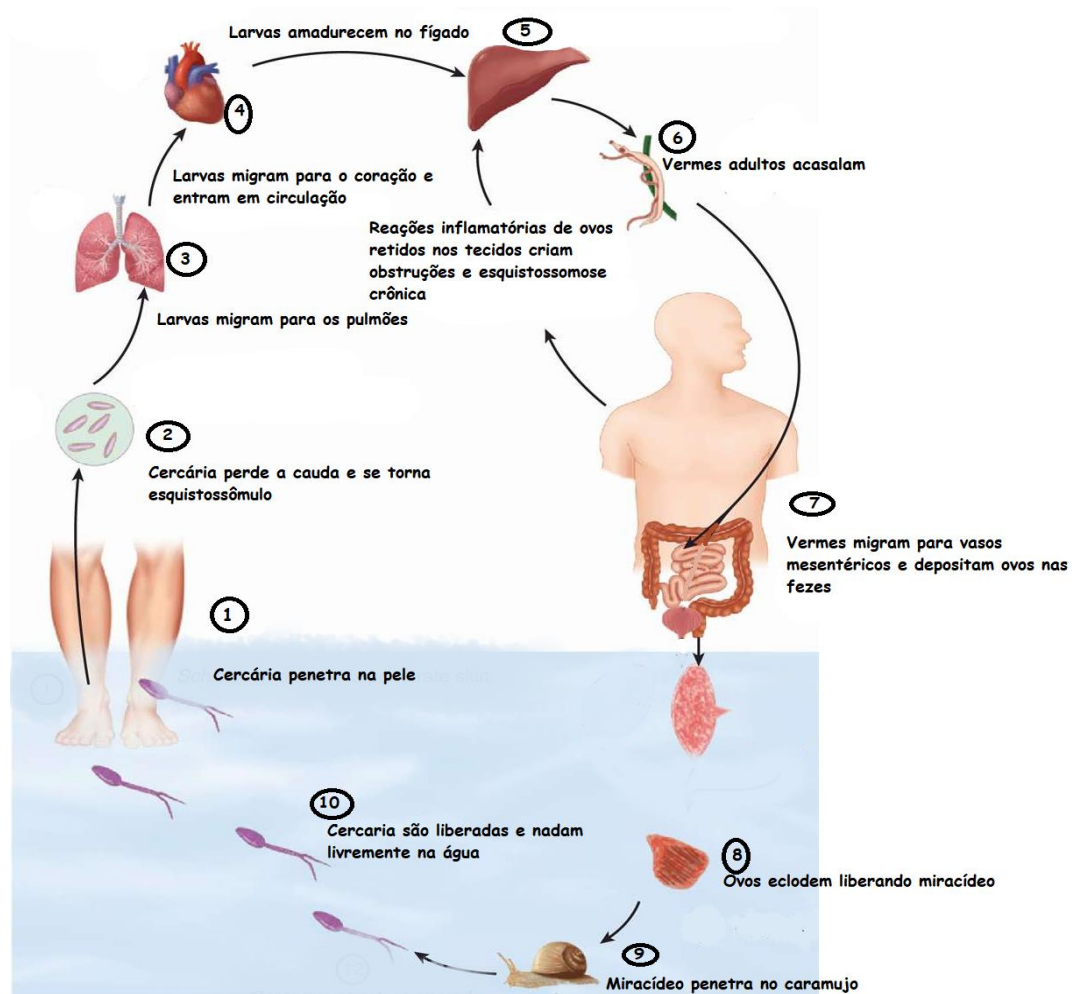
O agente etiológico da esquistossomose mansônica *S. mansoni*. é um helminto da classe dos Trematoda, família Schistosomatidae e gênero *Schistosoma*. São organismos digenéticos, finos, esbranquiçados e dioicos, durante o acasalamento a fêmea adulta, mais alongada, encontra-se inserida em uma fenda do 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, 2010c; Brasil, 2009).

A transmissão parasitária (Figura 1) 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 *Biomphalaria* tem início um complexo processo de alterações morfológicas originando os esporocistos primários e esporocistos secundários e por fim a cercaria. 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 cercarias 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. Estes ovos aí postos chegam ao tubo intestinal, reiniciando o ciclo (Barbosa et al., 2008; Brasil, 2005, Brasil, 2009).

Aproximadamente 50% dos ovos são eliminados nas fezes. O restante fica retido na submucosa intestinal, podendo ser arrastados para várias partes do corpo. A resposta imune em torno do ovo produz uma reação granulomatosa, que é a principal responsável pela patologia da doença (Jenkins-Holick & Kaul, 2013).

Figura 1: Ciclo biológico do *Schistosoma mansoni*. Fonte: Weerakoon et al., 2015. Adaptado



1.2.2.2 Epidemiologia

Pela sua prevalência e elevada morbidade, a esquistossomose está entre os mais importantes problemas de saúde pública de áreas tropicais e subtropicais, onde o fator socioeconômico, determinando más condições de habitação e higiene, favorece seu processo de disseminação. 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, 2017).

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; Santos, 2008).

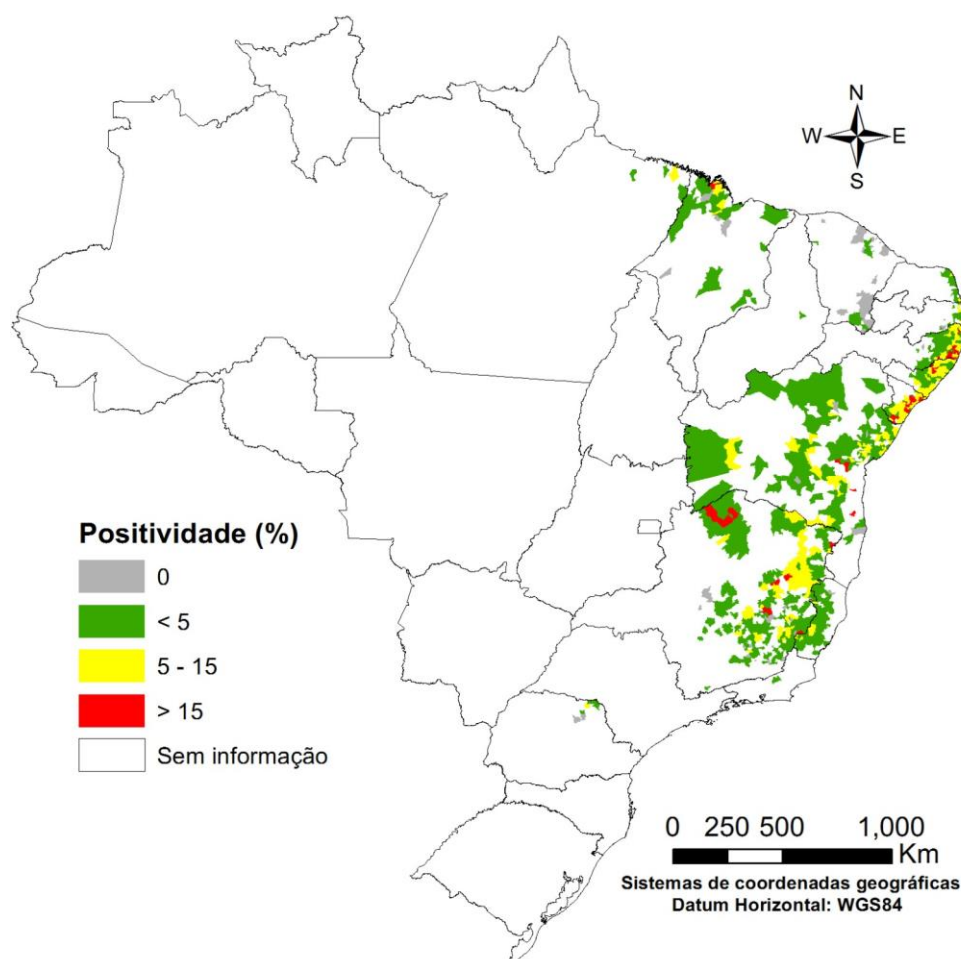
O sistema nervoso central (SNC) pode ser acometido pelas infecções do *Schistosoma Mansoni*, *S. haematobium* e *S. japonicum* (Braga et al., 2003) Esta última é mais frequentemente associada à infecção cerebral, que possui prevalência sintomática entre 2 a 4% na população portadora de esquistossomose desta espécie. Já as outras duas são mais associadas à forma mielorradicular, forma mais comum da doença esquistossomótica do SNC, especialmente o *S. mansoni*, única espécie existente nas Américas (Andrade Filho et al., 2015).

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. No ano de 2013 este numero diminuiu para 141 óbitos, em 2014 foram realizados 256.660 exames parasitológicos de fezes em 117 municípios. A positividade de *Schistosoma mansoni* variou de 0,1% a 22,0% nos municípios endêmicos (Brasil, 2013; Pernambuco, 2015).

Figura 2: Distribuição da esquistossomose, de acordo com o percentual de positividade por município no Brasil no período de 2010 a 2015. Fonte: Brasil, 2013.



Diante destes fatos o Ministério da saúde elaborou o “**Plano Integrado de Ações para o Enfretamento às Doenças Negligenciadas no Estado de Pernambuco/ SANAR – 2015 – 2018**”, um plano de ações estratégicas de combate e definiu um conjunto de endemias

negligenciadas e/ou relacionadas à 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).

1.2.2.3 Características Clínicas

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 cercarias 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, cefaleia e tosse seca. 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 3). Em casos mais graves, devido à 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 3: Paciente com a forma hepatoesplênica da esquistossomose mansoni. Fonte: Carvalho et al., 2008c.



Destaca-se ainda que, manifestações através de lesões ectópicas de pele são raras em pacientes acometidos pela esquistossomose e podem ocorrer tardiamente (Figura 4). 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). Várias manifestações cutâneas estão associadas à infestação pelo *Schistosoma*. Dentre elas a dermatite cercariana que resulta da penetração das cercarias 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 et al., 2011).

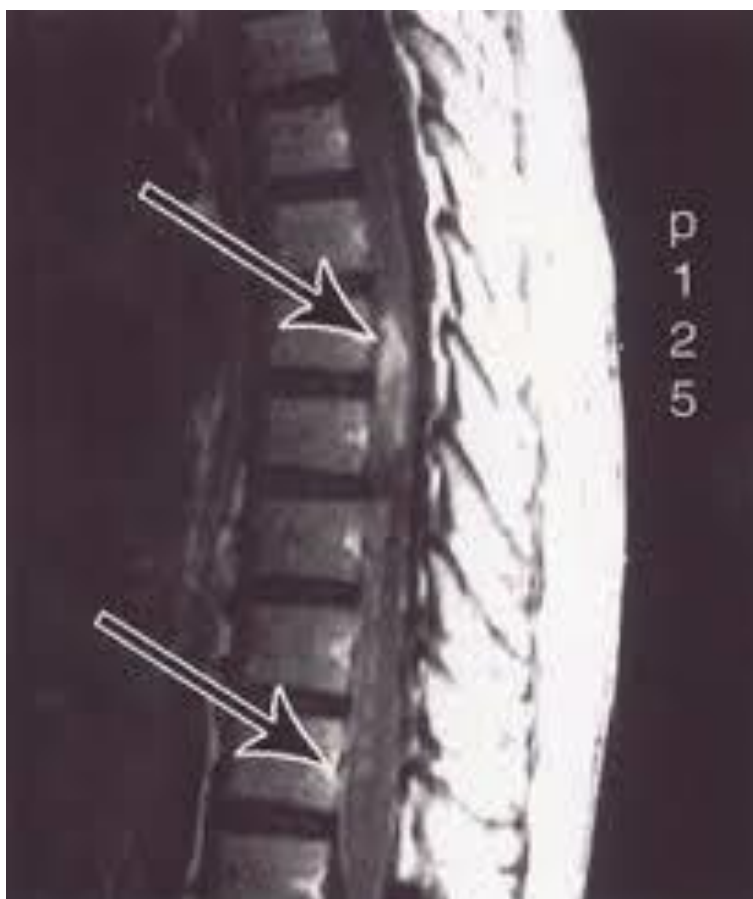
Figura 4: Manifestação cutânea da esquistossomose. Fonte: Nunes et al., 2013.



O sistema nervoso central (SNC) pode ser acometido nas infecções pelo *Schistosoma mansoni*, mas também pelo *S. haematobium* e o *S. japonicum*. A deposição assintomática de ovos no SNC é frequente. Quando sintomáticas, as duas primeiras espécies citadas provocam mais frequentemente síndrome mielorradicular, e a última ocasiona envolvimento cerebral (Brasil, 2006). A NE pode se manifestar clinicamente por meningiomielorradiculite, mielite, radiculite ou pela forma pseudotumoral cerebral ou medular. Seu diagnóstico é fundamentado em dados epidemiológicos, clínicos e laboratoriais. Apesar da complicação neurológica desta parasitose ser relativamente rara, nas últimas duas décadas o número de relatos de casos vem aumentando consideravelmente, principalmente em nosso país (Andrade Filho, 2015).

A principal determinante da lesão no SNC pela infecção pelo *Schistosoma mansoni* é a reação inflamatória da deposição de ovos do parasito no tecido nervoso (Brisson et al., 2014). A história epidemiológica associada à exposição da cercaria ou de infecção prévia auxilia o diagnóstico. Entretanto a MRE pode ocorrer na ausência deste relato, e ainda muitos anos após o desaparecimento das manifestações intestinais. Inicialmente o paciente apresenta dor lombar ou de MMII (membros inferiores), seguido de disfunção vesical, paresia e parestesia de MMII, e impotência sexual (Santos et al., 2001; Silva et al., 2004). A evolução é aguda ou subaguda com duração de 15 dias em média, até a instalação completa de mielorradiculopatia. Na ausência de tratamento, 95% dos pacientes evoluem para a morte ou sequelas neurológicas com disfunção motora dos MMII, esfinteriana e erétil, além de dor parestésica de MMII (Peregrino et al., 2002; Silva et al., 2004;). A figura abaixo mostra ressonância magnética de paciente com manifestações da MRE.

Figura 5 Alargamento do cone medular (seta inferior) e captação homogênea e circunscrita de contraste em medula torácica baixa (seta superior) em paciente com mielopatia esquistossomótica: Brasil, 2006.



A NE cerebral geralmente se apresenta como lesão expansiva intracraniana, de evolução lenta. As manifestações clínicas são variáveis e dependem principalmente do local da lesão e da hipertensão intracraniana causada pelo efeito de massa dos granulomas. Cefaleia, papiledema, anormalidades visuais, distúrbios da fala, alterações sensitivas, hemiparesia, nistagmo e ataxia são manifestações comuns. A duração das manifestações clínicas varia de algumas semanas a mais de um ano (Peregrino et al., 2002).

É importante ressaltar que a ocorrência da MRE, diferentemente de outras formas graves da esquistossomose, como a hepatoesplênica e a hipertensão pulmonar, não depende de cargas parasitárias elevadas. Ao contrário, geralmente os pacientes portadores da MRE apresentam poucos ovos por grama de fezes e muitas vezes são provenientes de áreas de baixa prevalência (Brasil, 2006). Esses achados justificam o interesse no desenvolvimento de novos métodos diagnósticos mais precisos e eficientes para esta patologia. Já que, diagnóstico e tratamento precoces permitem um melhor prognóstico com a preservação ou recuperação completa da função neurológica (Andrade Filho et al., 2015; Nobre et al., 2001; Peregrino et al., 2002).

1.2.2.4 Patogenia

A patogênese da esquistossomose mansônica está intimamente relacionada à interação humano/helminto. Durante seu ciclo evolutivo nos diferentes tecidos do hospedeiro intermediário, o *S. mansoni* passa por importantes alterações morfológicas e bioquímicas que servem como “escape” contra o sistema imunológico deste hospedeiro. A partir das 12 primeiras horas após a penetração das cercarias, ocorre uma importante reação inflamatória, originando a denominada dermatite cercariana, sendo esta a primeira linha de defesa contra a infecção (Cavalcanti et al., 1998; Milan; Keim, 2007; Lichtenbergova et al., 2008).

O acontecimento patogênico mais relevante na esquistossomose é a formação de granulomas hepáticos e a fibrose hepática peri-portal (Carvalho et al., 2008a). Durante a ovoposição, aproximadamente 60% dos ovos são expelidos na luz intestinal. Os demais permanecem alojados nas mucosas do intestino (Prata, 2007). Destes ovos uma parte permanece alojada enquanto outros vão sendo carreados pela circulação mesentérica até o fígado, onde ficam presos nos sinusoides hepáticos (Souza et al., 2011). A formação dos

granulomas em diferentes tecidos explica as manifestações da esquistossomose, principalmente: a hipertensão portal (granuloma hepático); formação de pseudotumores (granulomas no omento e na parede intestinal); disfunções neurológicas (granulomas no sistema nervoso central) e lesões vasculares pulmonares (granulomas nos vasos pulmonares) (Carvalho et al., 2008d).

Apresentações ectópicas da esquistossomose ocorrem quando os ovos do parasita ou formas adultas estão localizados longe do seu local habitual (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; Coelho, 2000). O ciclo de vida do *Schistosoma* é bem estabelecido. No hospedeiro definitivo, após as cercarias 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 (Tranquilini et al, 2011).

Em relação ao SNC, são consideradas fundamentais as lesões caudadas por três fatores: o ovo do parasito com liberação de antígenos e formação do granuloma; o verme adulto e os complexos imunes (antígeno/ anticorpo) circulantes com depósitos nos tecidos (Andrade Filho et al., 2015). Os ovos que alcançam o SNC formam grandes granulomas em área circunscrita, respondendo pela produção do efeito de massa com sinais neurológicos de aumento da pressão intracraniana (Serapião et al., 2009).

A neuroesquistossomose ocorre quando os ovos, não são eliminados nas fezes ou na urina, em vez disso, se espalham para o sistema nervoso central e provocam a formação de granulomas. O envolvimento do cérebro (esquistossomose cerebral/encefálica ou doença granulomatosa cerebral) muitas vezes leva a convulsões, enquanto o envolvimento da medula espinhal (esquistossomose medular ou mielorradiculopatia esquistossomótica) pode causar compressão na medula culminando em paralisia (Rose et al., 2014). Os ovos podem atingir o sistema nervoso central por três mecanismos: shunts pulmonares arteriovenosos, embolização retrógrada pelo plexo venoso vertebral de batson (Melo; Coelho, 2005; Nascimento-Carvalho et al., 2005; Andrade-Filho et al., 2015) ou migração anômala de vermes adultos para locais próximos ao sistema nervoso central, seguido de deposição de ovos in situ (Lins et al., 2008).

1.2.2.5 Diagnóstico

O diagnóstico da esquistossomose pode ser realizado por métodos de detecção direta, indireta, qualitativos ou quantitativos. Quando há a observação da presença do parasita ou fragmentos dele é denominado método direto. Os métodos indiretos são baseados na detecção de marcadores bioquímicos, clínicos ou imunológicos para atestar a presença do parasita. Os métodos qualitativos são classificados em positivos, na presença do parasita, ou negativos, na ausência do parasita, e têm a capacidade de identificar os tipos de parasitas. E por fim, os métodos quantitativos que além de identificar a presença do parasita, determinam o número de ovos por grama de fezes (Ferreira, 2016). Dentre os métodos disponíveis para a detecção da esquistossomose o Kato-Katz é considerado padrão ouro pelo Ministério da Saúde do Brasil e pela Organização Mundial da Saúde (Barbosa et al., 2017).

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 ao tamanho e a forma característica com uma espinha lateral ou terminal (Brasil, 2014). Para um diagnóstico eficaz, a escolha da técnica adequada para a realização do exame parasitológico de fezes (EPF) é fundamental. No caso da esquistossomose, as técnicas apresentadas no quadro 1 são as técnicas parasitológicas de escolha, sendo o Kato-Katz o mais comumente utilizado. Nesta técnica é indicada a realização de análise de mínimo, três amostras de fezes coletadas em dias alternados, uma vez que o *S. mansoni* possui uma baixa carga parasitária, tornando esse exame pouco sensível (Vitorino et al., 2012). 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 (Melo; Coelho, 2016). A técnica de Kato-Katz apresenta ainda outras limitações, dentre elas a impossibilidade de execução em amostras diarreicas, não detectar cistos de protozoários e larvas de helmintos, baixa reprodutibilidade entre amostras e entre lâminas diferentes de uma mesma amostra e entre leituras de examinadores diferentes (Kongs et al., 2001).

Quadro 1: Exames parasitológicos para o diagnóstico da esquistossomose mansônica. Fonte: Ferreira, 2016

Métodos qualitativos	Métodos quantitativos
Método de sedimentação espontânea (HJP)	Método Kato-Katz
Método de flutuação	Método de eclosão de miracídios
Método de centrifugação em éter sulfúrico	Gradiente salínico
Método Centrífugo-sedimentação (MIFC)	Helmintex
Reação peri-ovular	

É importante ressaltar que, exames parasitológicos negativos não significam necessariamente que os indivíduos não estejam infectados. Por isto, muitas vezes é necessária a realização de uma biópsia retal, para a confirmação ou exclusão do diagnóstico. A biópsia possui maior sensibilidade, dando mais confiabilidade ao diagnóstico quando comparada ao EPF. Porém, ela só é realizada em casos específicos como dificuldades na coleta (Vitorino et al., 2012). Na análise pela biópsia retal, fragmentos da mucosa retal são examinados à procura de ovos de *S. mansoni*. A quantificação de ovos por grama de tecido examinado recebe o nome de oograma. Este procedimento possibilita a avaliação da intensidade da infecção e é empregada quando repetidos exames de fezes resultam negativos ou na avaliação de eficiência terapêutica. É uma técnica que exige a coleta de amostra por meio de um procedimento invasivo e bastante incômodo, realizado em ambiente hospitalar com pessoal especializado (Ferrari; Drummond; Reis, 2008). Desta forma, não é recomendado para pesquisas epidemiológicas.

Os ensaios imunológicos são importantes ferramentas para o diagnóstico da esquistossomose, eles podem ser realizados de duas maneiras, a primeira detectando anticorpos produzidos pelo homem contra o parasito, conhecido como método indireto, ou detectando antígenos liberados na corrente sanguínea do hospedeiro pelo parasito em diversos estágios de seu desenvolvimento: antígeno cercariano, do ovo e antígenos associados ao intestino do verme adulto, também conhecido como método direto (Rabello et al., 2008). A detecção de anticorpos pode ser útil em determinadas circunstâncias, tais como em pacientes não excretadores de ovos, mas a sua aplicação é limitada (Melo; Coelho, 2016). 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 além de permanecerem positivos durante anos após a cura quimioterápica (Ross et al., 2002; Stothard et al., 2009). A maioria das técnicas se baseia 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 (Brasil, 2017; Melo; Coelho, 2016). A positividade em um desses métodos não define a presença de infecção esquistossomótica ativa, pois somente indica resposta do sistema imune do hospedeiro a determinados antígenos parasitários (Rabello et al., 2008).

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., 2012; Wang et al., 2018). Porém estudos demonstram que sua sensibilidade e/ou especificidade ainda não são suficientes para um diagnóstico definitivo (Li et al., 2010).

Ensaio baseados 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. Esta técnica permite a amplificação de DNA ou RNA do agente infeccioso, copiando-as em larga escala de modo específico. A sensibilidade desta técnica é bastante satisfatória, sendo o limite de detecção de cerca de um fentograma (10^{-15} g) (Ten Hove et al, 2008; Wichmann et al., 2009; Gomes et al., 2010; Ibironke et al., 2011; Carvalho, 2008b). 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. Estão associadas também a PCR desvantagens como a possibilidade de inativação enzimática e a contaminação das amostras testadas. Sendo assim uma técnica limitada para uso em larga escala não disponível para a rotina (Carvalho et al., 2008b; Rollinson et al., 2013, Rabello, 2008).

A mielorradiculopatia esquistossomótica (MRE) tem seu diagnóstico subestimado pelas dificuldades de obtenção de sua confirmação e pela exclusão de seus diagnósticos diferenciais (Nascimento et al., 2014). O sexo masculino é o gênero mais acometido pela MRE correspondendo de 69-83% dos casos com prevalência entre jovens em idade produtiva (Brisson et al., 2014). Isto se deve a sua maior exposição ocupacional (Brasil, 2006) e pelo aumento de pressão intra-abdominal por exercícios físicos contráteis, que favorecem a

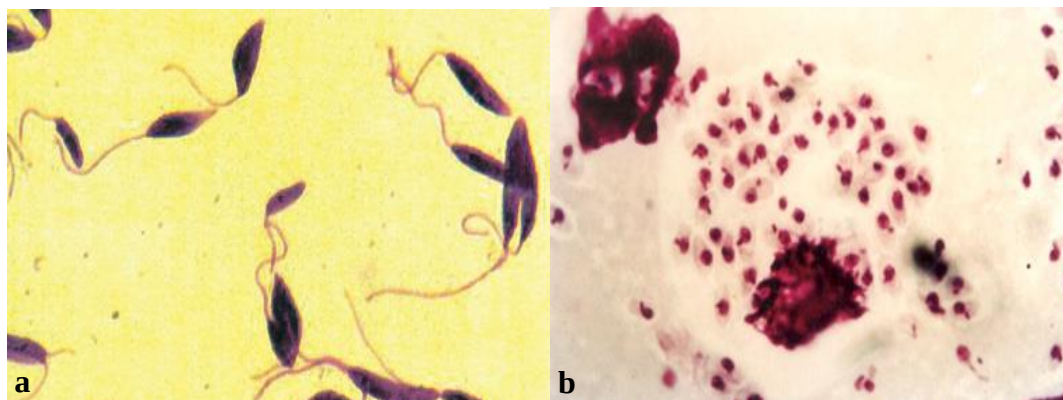
migração da esquistossomose e seus ovos para o sistema nervoso central a partir do plexo de Batson – comunicação entre o sistema porta e veia cava e as veias medulares e cerebrais (Silva, 2004). A demonstração de ovos no tecido nervoso por biópsia ou necropsia representa a única prova incontestável do acometimento medular pelo *Schistosoma*. Entretanto, o estudo histológico da medula espinhal envolve a realização de procedimento invasivo e com riscos de sequelas, para diagnóstico de uma doença cujo tratamento é eminentemente clínico e favorável. Assim, torna-se de extrema importância o esforço para o estabelecimento do diagnóstico não cirúrgico desta manifestação clínica da esquistossomose (Brasil, 2006). Portanto, o diagnóstico prático da NE se baseia na epidemiologia positiva através da história de contato com água possivelmente contaminada pelo *S. mansoni*, achados clínicos e complementares e pela exclusão de possíveis diagnósticos diferenciais (Lambertucci et al., 2007; Andrade-filho et al., 2015).

Ante o exposto, fica clara a necessidade de desenvolvimento de um método de detecção rápido, sensível e seletivo para a determinação da infecção pelo schistosoma tanto para a proteção da saúde quanto para a continuação do tratamento médico (Zhou et al., 2002).

1.2.3 Leishmaniose

As leishmanioses são doenças negligenciadas que afetam milhares de pessoas no mundo, principalmente as que se encontram socioeconomicamente vulneráveis (Romão et al., 2007). São doenças parasitárias causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, os quais são amplamente distribuídos pelo mundo e são capazes de infectar animais domésticos e silvestres bem como o homem quando este entra em contato com o ciclo de transmissão do parasita. A *Leishmania* é um protozoário pertencente à família *Trypanosomatidae* com duas formas principais: uma flagelada ou promastigota, encontrada no tubo digestivo do inseto vetor e em alguns meios de cultura artificiais, e outra aflagelada ou amastigota, que é vista nos tecidos dos hospedeiros vertebrados (homem e outros animais superiores) (figura 6). Atualmente encontram-se entre as seis endemias consideradas prioritárias no mundo. É uma doença crônica e sistêmica que quando não tratada pode evoluir para óbito em mais de 90% dos casos (Brasil, 2014b; Brasil, 2017; Brasil. 2000).

Figura 6: Formas da *Leishmania chagasi*. a) forma flagelada promastigota; b) forma aflagelada amastigota. Fonte: Brasil, 2006.



As leishmanioses constituem um variado grupo de enfermidades com diferentes manifestações clínicas, podendo afetar pele, mucosas e vísceras (Arruda, 2009). Nas Américas, as leishmanioses podem ser classificadas em dois grupos principais, Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e Leishmaniose Visceral (LV). A LTA é transmitida por várias espécies de flebotomíneos sendo as principais envolvidas: *Leishmania (Leishmania) amazonensis*; *Leishmania (Viannia) guyanensis* e *Leishmania (Viannia) braziliensis*, e pode variar na sua sintomatologia e na progressão clínica da doença dependendo do agente etiológico. As formas clínicas da LTA incluem a leishmaniose cutânea e a leishmaniose cutaneomucosa. No Brasil, o agente etiológico da leishmaniose visceral (LV) é a *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*) ambas são transmitidas por flebotomídeos do gênero *Lutzomyia* (Brasil, 2017).

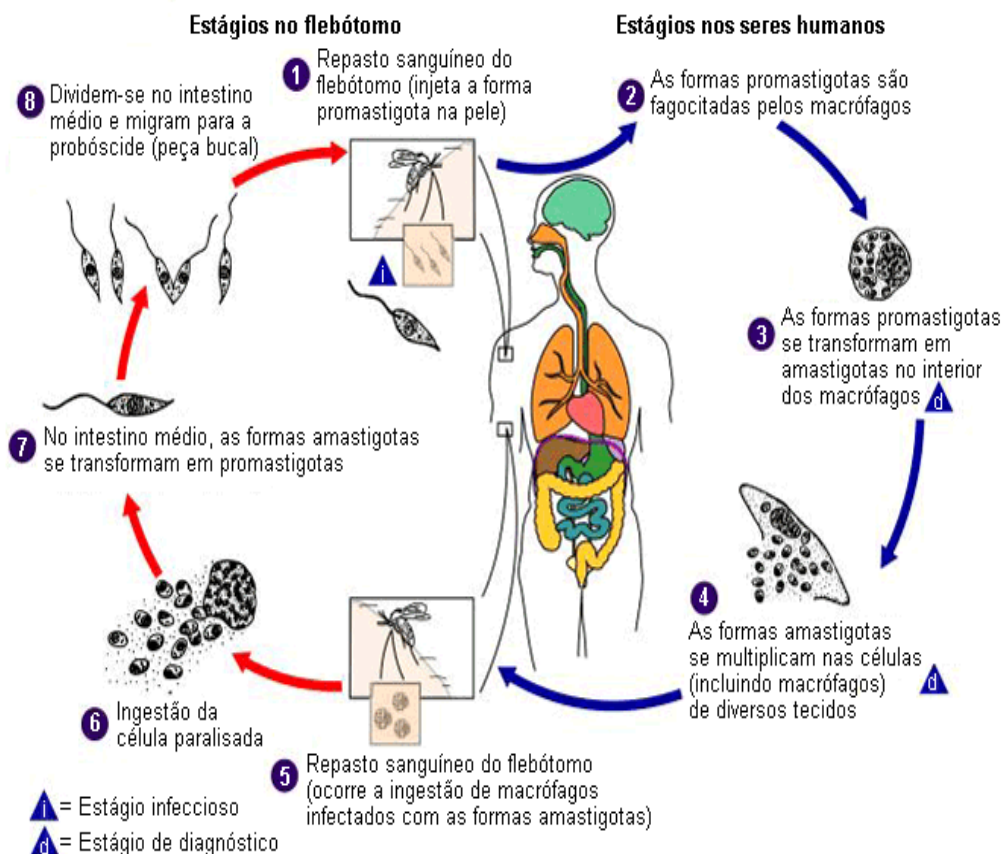
No País, existem atualmente sete espécies de *Leishmania* responsáveis pela doença humana e mais de 200 espécies de flebotomíneos implicados em sua transmissão. Trata-se de uma doença que acompanha o homem desde tempos remotos e que tem apresentado, nos últimos anos, aumento do número de casos e ampliação de sua ocorrência geográfica (Brasil, 2006a; Brasil, 2007).

1.2.3.1 Ciclo Biológico *Leishmania*

Os parasitas do gênero *Leishmania* são digenéticos (heteróxeos) e apresentam em seu ciclo de vida apenas duas formas evolutivas: a forma promastigota, que é flagelada e

extracelular, e a forma amastigota, que é intracelular e sem movimentos. A infecção do vetor ocorre quando as fêmeas, ao sugarem o sangue de mamíferos infectados, ingerem macrófagos parasitados por formas amastigotas da *Leishmania*. No trato digestivo anterior, ocorre o rompimento dos macrófagos liberando essas formas. Estes parasitas reproduzem-se por divisão binária e diferenciam-se rapidamente em formas flageladas denominadas de promastigotas, que também se reproduzem por processos sucessivos de divisão binária. As formas promastigotas colonizam o esôfago e a faringe do vetor (probóscida), onde permanecem aderidas ao epitélio pelo flagelo de onde podem então ser inoculados durante a próxima alimentação sanguínea do inseto (Brasil, 2014b). O ciclo biológico da *Leishmania* está representado na figura 7.

Figura 7: Ciclo biológico da *Leishmania sp.* no hospedeiro invertebrado e mamífero. Fonte: CDC – Centro de Controle e Prevenção de Doenças

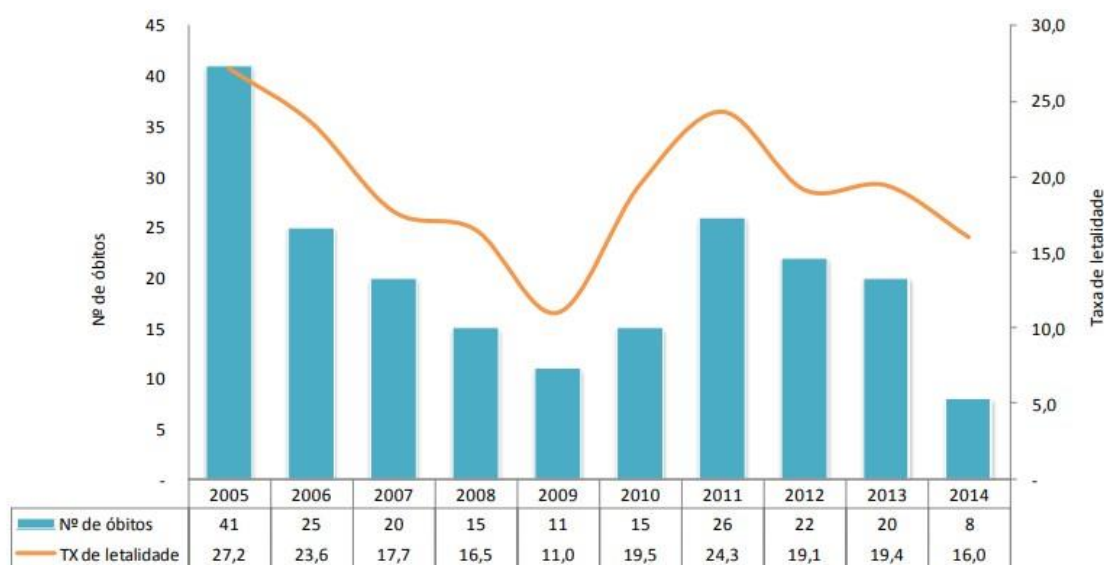


1.2.3.2 Epidemiologia

A LV é uma antroponose de elevada distribuição mundial, com registros em todos os continentes, com exceção da Oceania (Brasil, 2010). Na América Latina, a doença já foi descrita em pelo menos 12 países, sendo que 90% dos casos ocorrem no Brasil, especialmente na Região Nordeste. No país, o Ministério da Saúde estima que quase três mil pessoas sejam infectadas anualmente (Brasil, 2014b).

Em Pernambuco, a LV é historicamente endêmica, inicialmente com caráter rural e recentemente em expansão para áreas urbanas. No período de 2010 a 2014, foram 473 casos. Nesse mesmo período foram registrados 35 óbitos (Pernambuco, 2015). A Figura 8 apresenta o número de óbitos por LV e taxa de letalidade, segundo notificação entre os anos de 2005 e 2014 nos municípios do estado de Pernambuco.

Figura 8: Número de óbitos por leishmaniose visceral e taxa de letalidade, segundo ano de notificação em Pernambuco de 2005 a 2014. Fonte: Brasil, 2016



Apesar da notificação da doença ser obrigatória no Brasil, a quantidade elevada de novos casos e a dificuldade de diagnóstico em áreas isoladas ou desfavorecidas, limita a precisão de incidência e prevalência da doença. Além disso, no Brasil pode ocorrer outro

importante meio para a transmissão da doença sem a presença do vetor, pela via clássica, que é através de transfusão sanguínea. Isso se deve ao fato dos testes sorológicos para LV ainda não estarem incluídos na triagem dos doadores (Laurenti, 2010).

1.2.1.2.3 Características Clínicas

As Leishmanioses podem se apresentar com diferentes manifestações clínicas: comprometendo pele e mucosas (LTA) ou as vísceras (LV). A LTA classicamente se manifesta de duas maneiras: a forma cutânea e a mucosa (mucocutânea). A forma cutânea caracteriza-se por apresentar lesões indolores, com formato arredondado ou ovalado, apresentando base eritematosa, infiltrada e de consistência firme, bordas bem delimitadas e elevadas, fundo avermelhado e com granulações grosseiras. Já a forma mucosa caracteriza-se pela presença de lesões destrutivas localizadas na mucosa, em geral nas vias aéreas superiores (Fig. 9) (Brasil, 2017).

Figura 9: Leishmaniose Tegumentar Americana: **a)** forma cutânea. **b)** forma mucocutânea. Fonte: Murback et al., 2011.



Em seres humanos, a manifestação clínica clássica da LV é acompanhada de febre irregular e prolongada, perda de peso substancial, hepatomegalia, esplenomegalia, pancitopenia, hipergamaglobulinemia e anemia (Fig. 10) (Brasil, 2006b; Rey, 2011).

Figura 10: paciente com Leishmaniose visceral. Fonte: Brasil, 2006



1.2.3.4 Patogenia

A patogenia das leishmanioses se dá sob a influência de três importantes aspectos: os fatores inerentes ao hospedeiro, como por exemplo, suas características genéticas e como seu sistema imune responde a infecção; fatores próprios do parasita, como a virulência da espécie de *Leishmania* infectante; e ainda por fatores relacionados ao vetor, como sua competência vetorial. Desta interação, resulta uma variedade de manifestações clínicas, histopatológicas e imunopatológicas no homem. Desenvolve-se assim um comprometimento dos órgãos que formam o Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM), local de multiplicação do parasita que se hiperplasiam e se hipertrofiam em resposta à infecção (Dietze & Carvalho, 2003). Observam-se também alterações estruturais orgânicas ou teciduais como a esplenomegalia, hepatomegalia, adenomegalia, anemia, leucopenia e hipergamaglobulina (Brasil, 2000).

A infecção humana, pelas espécies de *Leishmania*, tem seu início logo após a inoculação das formas promastigotas do parasito na pele, o que acontece durante a hematofagia pelas espécies de flebotomíneos vetores. A partir desse momento, inicia-se um processo de escape do parasito frente às defesas do organismo, o qual, quando vencido pelo parasito, resultará na sua fagocitose pelas células do SFM, principalmente o macrófago. Assim, algumas das formas promastigotas infectantes, que conseguiram escapar da ação lítica do sistema imune do hospedeiro, são fagocitadas por macrófagos, nos quais, transformam-se em formas amastigotas dentro dos vacúolos parasitóforos dessas células; nesse microambiente passam a multiplicar-se por divisão binária. Em seguida, a evolução da infecção dependerá do perfil imunogenético do homem (Silveira et al., 2008).

1.2.3.5 Diagnóstico

Para a confirmação diagnóstica da leishmaniose tanto em humanos, quanto em cães é necessária a realização de exames laboratoriais. Comumente, os testes laboratoriais incluem exames parasitológicos e /ou sorológicos (Brasil, 2006).

O diagnóstico parasitológico é considerado um método invasivo, não sendo indicado para estudos epidemiológicos, no entanto, é padrão-ouro para resultados positivos quando comparado a outras técnicas. Sua especificidade pode chegar a 100%, porém com sensibilidade variada, já que, a distribuição do parasita nos tecidos não é homogênea (Gontijo; Melo, 2004). A análise consiste na observação de formas amastigotas livres ou no interior de macrófagos em biópsias de pele, aspirados de linfonodos, medula óssea, baço e biópsia hepática, pois estes são os órgãos mais comumente parasitados (Sakkas et al., 2016). Para a realização do exame direto, uma pequena quantidade do material aspirado é depositada em uma das extremidades da lâmina e o material é espalhado na direção oposta. Após a secagem, a lâmina será fixada em álcool metílico e posteriormente corada. O material coletado é corado com corantes de rotina, como, por exemplo, o Giemsa, Wright e Panótico. Recomenda-se ao menos a análise de quatro lâminas (Brasil, 2006).

Métodos parasitológicos alternativos como: cultura *in vitro* de fragmentos de tecidos ou aspirados e a inoculação em animais de laboratório também podem ser realizados, no entanto, estes testes não são viáveis para utilização na rotina, pois é necessário um longo tempo para

obtenção de resultados (Quinnell et al., 2009). Em isolamento em meio de cultura (in vitro) as formas amastigotas do parasita obtidas a partir de punções aspirativas quando inoculadas em meios de cultura especiais contendo ágar e sangue de coelho, transformam-se em formas promastigotas. As culturas devem ser conservadas em aproximadamente 24°C e observadas em microscopia óptica semanalmente, até quatro semanas (Brasil, 2006). Esse método diagnóstico possui baixa sensibilidade, principalmente no início da doença, quando a carga parasitária é leve, e apesar de ser útil para o isolamento do parasito, não é utilizado na rotina (Ikeda-Garcia e Feitosa, 2006).

Diante disto, com o intuito de evitar o uso de métodos invasivos e considerando que a resposta humoral na LV é intensa, com altos índices de imunoglobulinas, o diagnóstico passou a ser focado em métodos sorológicos (Gomes et al., 2008). Diferentes técnicas sorológicas têm sido utilizadas no diagnóstico da LV humana e canina. Os procedimentos mais utilizados são: Ensaio de Imunoadsorção Enzimática (ELISA) e Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI). O teste padrão ouro mundialmente indicado como comprovação final no diagnóstico da leishmaniose é a RIFI. O teste ELISA é utilizado principalmente para detecção de anticorpos, quando se deseja realizar um levantamento soropidemiológico prático, menos oneroso e rápido. Já que a RIFI apresenta maior grau de especificidade e que o ELISA apresenta maior grau de sensibilidade para esta doença (Távora et al., 2007).

Apesar de na RIFI os reagentes serem de fácil acesso, facilitando o uso desta técnica, outras questões limitam o seu uso e retardam o diagnóstico do paciente, como a necessidade de técnicos treinados e infraestrutura laboratorial adequada, com microscópio de fluorescência. Também se destaca como fator limitante a ocorrência de reações cruzadas com diversas doenças, principalmente com *Trypanosoma cruzi*, devido à proximidade filogenética existente entre os dois parasitos (Elmahallawy et al., 2014; Sakkas et al., 2016). Nos casos de LV, comumente são observados títulos elevados de anticorpos no soro, geralmente superiores a 1:80, sendo que títulos inferiores necessitam de confirmação por outras metodologias (Alves; Bevilacqua, 2004).

O diagnóstico da leishmaniose também pode ser feito por ELISA, que é altamente sensível e a especificidade depende do antígeno utilizado, geralmente utiliza-se o antígeno bruto, derivado de um lisado de promastigotas de *Leishmania* spp. O teste, possui sensibilidade de 97% a 100% (Laurenti et al., 2013) e especificidade de 88% a 100%, quando

são usados antígenos brutos (Rosário et al., 2005). O ELISA, no entanto pode apresentar reatividade cruzada com outras patologias causadas por tripanosomatídeos, como leishmaniose tegumentar e Doença de Chagas e mesmo com outras espécies geneticamente distintas de tripanosomatídeos. A ampla utilização desta técnica ocorre principalmente por possibilitar o emprego de diferentes tipos de antígeno e apresentar elevado rendimento, podendo diagnosticar até 94 pacientes em apenas uma placa. É um teste rápido, de fácil execução e leitura, sendo um pouco mais sensível e um pouco menos específico que a RIFI. O teste é sensível, permitindo a detecção de baixos títulos de anticorpos, mas é pouco preciso na detecção de casos subclínicos ou assintomáticos (Gontijo; Melo, 2004). Entretanto, a técnica requer também infraestrutura laboratorial, como espectrofotômetro, pipetas e estufas o que onera e prolonga o tempo de análise (Elmahallawy et al., 2014).

A PCR Também tem sido descrita como um método sensível para a detecção do parasita, independente da imunocompetência ou da história clínica do paciente. Muitos centros de pesquisa têm avaliado o uso da PCR para diagnóstico de LV utilizando sangue periférico, considerando que a biopsia esplênica e a punção de medula óssea não são técnicas adequadas para uso fora do ambiente hospitalar (Gontijo. Melo, 2004).

Um aspecto limitante em relação ao diagnóstico da leishmaniose no homem é a ausência de um teste capaz de identificar com eficiência os casos com formas leves da doença (Brasil, 2010b). Além disto, apesar da LV está associada a apenas uma espécie de parasito, ainda não existe um consenso quanto ao uso de um antígeno para o uso no sorodiagnóstico desta doença (Laurenti, 2010).

Exames imunológicos, como intradermoreação de Montenegro (IDRM), são métodos indiretos que também auxiliam na definição diagnóstica (Murbach et al., 2011). A IDRM é comumente empregada no diagnóstico na leishmaniose tegumentar, exibindo resultado positivo na doença. No entanto, na leishmaniose visceral, a IDRM tem um comportamento diferente, ficando negativa durante a fase ativa da doença e tornando-se positiva após semanas ou até anos de tratamento. A IDRM também é útil no diagnóstico da forma assintomática ou inaparente de LV em áreas endêmicas (Caldas, et al. 2010).

O diagnóstico diferencial deve ser realizado para excluir a presença de enterobacteriose de curso, malária, brucelose, febre tifoide, esquistossomose hepatoesplênica, forma aguda da doença de chagas, linfoma, mieloma múltiplo, anemia falciforme, entre outras. Em adição, o

diagnóstico da coinfeção com HIV tem implicações na abordagem da leishmaniose em relação ao diagnóstico, à indicação terapêutica e à ocorrência de recidivas. Desta forma, deve-se oferecer a sorologia para HIV para todos os pacientes com LV, independentemente da idade (Brasil, 2014b).

De um modo geral, o diagnóstico da LV ainda é considerado um problema nos serviços de saúde, principalmente pela carência de testes diagnósticos com alta sensibilidade e especificidade (Rosário, 2005). Daí a necessidade de desenvolvimento de novas metodologias de detecção deste parasita que venham a suprir as limitações existentes nos métodos atuais.

Os principais métodos diagnósticos para a detecção da esquistossomose e leishmaniose estão relacionados no quadro abaixo:

Método	Vantagens	Desvantagens
Kato-Katz (<i>S. mansoni</i>)	Alta especificidade, baixo custo e fácil manuseio	Ineficiente em baixas cargas parasitárias
Exame direto (<i>L. chagasi</i>)	Especificidade de até 100%	É um método invasivo
ELISA	Maior sensibilidade que o teste de imunofluorescência com a vantagem de ser mais econômico	Não diferencia infecção prévia, ativa ou reinfeção
RIFI	Bons índices de sensibilidade e especificidade	Necessidade de microscópio de fluorescência o que limita o uso dessa técnica em áreas com pouca infraestrutura
PCR	Alta sensibilidade e especificidade	Possibilidade de inibição da enzima e o risco de contaminação das amostras
Biossensor	Alta especificidade e sensibilidade, facilidade de manuseio e baixo custo	Instabilidade das ligações influenciáveis pelas condições do meio, como temperatura e pH

1.2.4 Biossensores

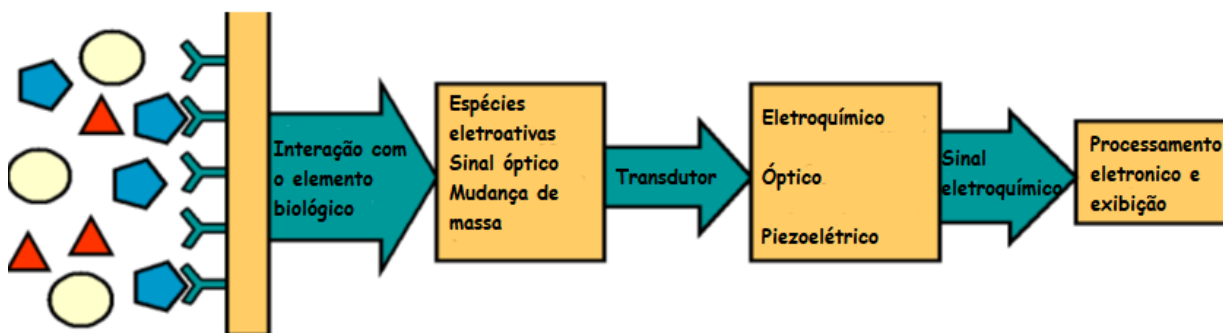
A *International Union of Pure and Applied Chemistry* – IUPAC propõe a seguinte definição para biossensor: “Um biossensor é um instrumento integrado que é capaz de fornecer uma informação analítica específica, quantitativa ou semi-quantitativa através do uso de um elemento de reconhecimento biológico (receptor bioquímico) que está em contato direto com o elemento de transdução” (Thévenot, 2001). Desta forma, a interação específica deriva de mudanças de uma ou mais propriedades físico-químicas (alteração de pH, transferência de elétrons, alteração de massa, transferência de calor, liberação de gases ou íons específicos) que são detectadas pelo transdutor (Arya et al., 2012). O principal objetivo desses dispositivos é produzir um sinal eletrônico proporcional à concentração do analito específico em tempo real (Luong et al., 2008). Assim, 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).

Seus componentes principais são basicamente o biorreceptor e o transdutor de sinal (Reimhult et al., 2008; Thévenot et al., 2001). Sendo o biorreceptor a plataforma onde ocorrem as reações biológicas e o transdutor o responsável por converter os processos de biorreconhecimento em sinais mensuráveis (Zhang et al., 2000). 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).

Em relação aos biossensores eletroquímicos estes são descritos também pela IUPAC como sendo: “um dispositivo integrado autorreferente (self-contained), capaz de fornecer informação analítica específica, quantitativa ou semiquantitativa, utilizando um elemento de reconhecimento biológico (receptor bioquímico), o qual é mantido em contato espacial direto

com um elemento de transdução eletroquímica” (Thévenot et al., 2001; Willner, 2001). Os biossensores são sensores químicos, em que o sistema de reconhecimento utiliza um mecanismo biológico como representado na Figura 11.

Figura 11: Representação esquemática de um biossensor. Fonte: Próprio autor



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 outros elementos biológicos como: células ou organelas de seres vivos que 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 em outra espécie química através de uma reação bioquímica, produzir ou libertar outro produto químico, alterar as suas propriedades ópticas, elétricas ou mecânicas ou produzir qualquer outra resposta que possa ser quantificada (Lojou et al., 2006; Chaubey et al., 2002; Mello; Kubota, 2002; Campàs et al., 2008).

1.2.4.1 Classificação dos Biossensores

Os biossensores podem ser classificados a partir de diferentes parâmetros. Podem ser classificados de acordo com a especificidade biológica que confere o mecanismo de

reconhecimento ou pelo modo da transdução do sinal, ou ainda considerando o reconhecimento biológico e o modo de transdução de forma conjunta (Thévenot et al., 2001).

No que diz respeito ao material biológico pode ser dividido em várias classes como, por exemplo, os biossensores enzimáticos que apresentam enzimas como elemento de biorreconhecimento, imunossensores que utilizam proteínas globulares de soro (tais como imunoglobulinas) e antígenos como bioreceptores, quimiossensores que se trata 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 e Anthony, 2003; Nakamura e Karube, 2003; Loureiro et al., 2010).

Já no tocante a categoria de transdutores 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. (Furtado et al., 2008; Singh, 2008). Neste trabalho, somente será descrito de forma mais abrangente os biossensores eletroquímicos por estes serem nosso objeto de estudo e aplicação.

1.2.4.2 Biossensor Eletroquímico

Os biossensores eletroquímicos são os mais utilizados quando comparados as classe de sensores ópticos e calorimétricos, devido a sua maior estabilidade, *screening* mais rápido, elevada sensibilidade além de serem econômicos e passíveis de automação (Melo; Kubota, 2007). Nestes biossensores, 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 parâmetros 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. 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 (Song et al, 2006). Além disto, técnicas eletroquímicas permitem o estabelecimento de relações diretas entre a concentração do analito e determinadas características elétricas como, por exemplo, potencial, corrente, resistência e condutividade (Souza, 2003). Desta maneira, os biossensores eletroquímicos constituem a grande maioria dos biossensores desenvolvidos para uso em análises clínicas (Song et al 2006).

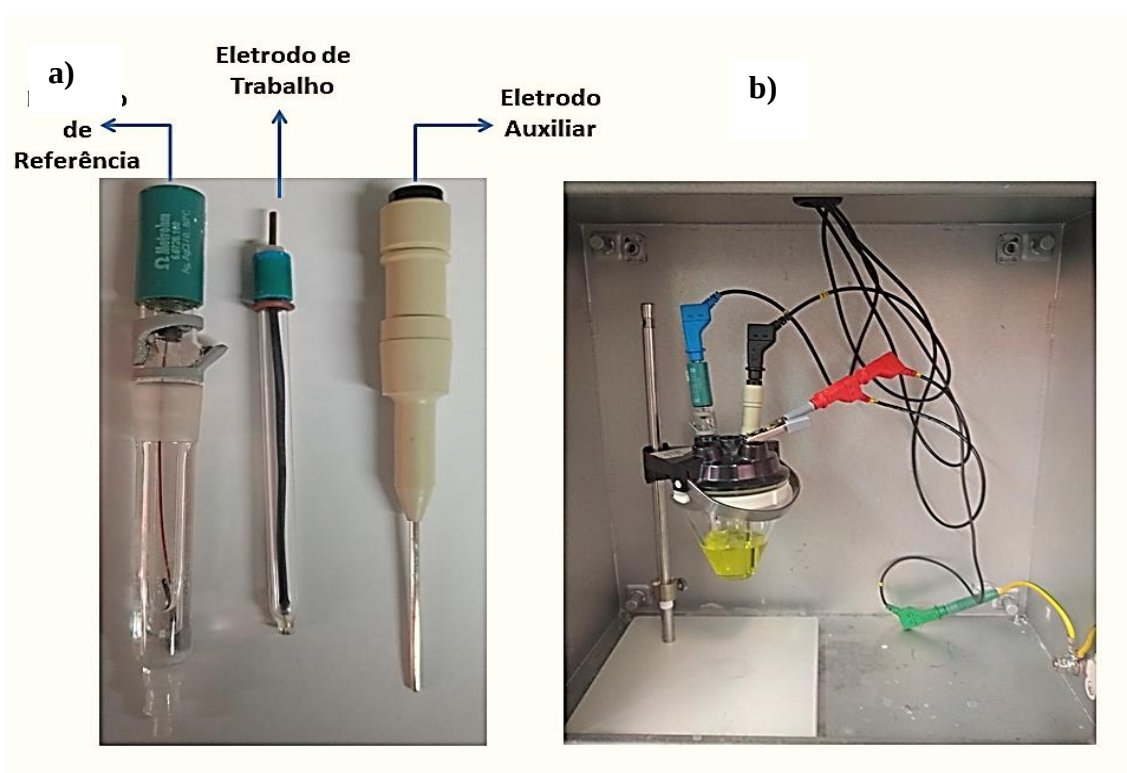
A eletroquímica é um processo interfacial que envolve a transferência (ou o impedimento desta) de um elétron de uma espécie em solução para o eletrodo ou do eletrodo para a solução. Para que a eletroquímica possa ser utilizada como ferramenta de análise é necessário que ocorra um contato entre o eletrodo e o analito/eletrolito 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 as alterações causadas pela resistência da célula no controle do potencial do eletrodo de trabalho (Figura 12) (Diamond, 1998; Bard & Faulkner, 2001).

É necessário o uso do potenciostato/galvanostato 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 parâmetro

alterado estes métodos eletroanalíticos podem ser divididos em amperométricos, potenciométricos, condutimétricos e impedimétricos.

Na detecção potenciométrica esses dispositivos medem a diferença de potencial entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência em condições de corrente elétrica constante (Pohanka, 2008; Privett, 2010). Na detecção potenciométrica a diferença de potencial é medida após a aplicação de valores distintos de correntes (Stradiotto et al., 2003).

Figura 12: a) Eletrodo de referência, de trabalho e auxiliar. b) Célula eletroquímica convencional de três eletrodos. Fonte: Próprio autor.



Os sensores eletroquímicos condutimétricos baseiam-se em processos químicos que ocorrem em solução e que levam a uma alteração da condutividade iônica das soluções. Em geral a sensibilidade para esta variável é muito baixa (Mohanty, 2006). O método condutimétrico utiliza como fonte de dados às mudanças na condutância entre dois eletrodos quando um potencial alternado é aplicado, já o impedanciométrico esta relacionada à habilidade do material sensor detectar variação na impedância do eletrodo (D'orazio, 2003; Rumayor, 2005; Rahaie e Kazemi 2010).

A detecção amperométrica baseia-se na mensuração da corrente resultante do processo de oxidação ou redução eletroquímica de uma espécie eletroativa. É obtida através da manutenção de um potencial constante a um eletrodo de trabalho ou em uma 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, conseguindo-se assim que a espécie a ser determinada reaja e uma corrente seja gerada.

Segundo a IUPAC a detecção amperométrica 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.

O quadro abaixo mostra os tipos de transdutores eletroquímicos e suas principais características.

Quadro 2: Principais transdutores utilizados em análises eletroquímicas.

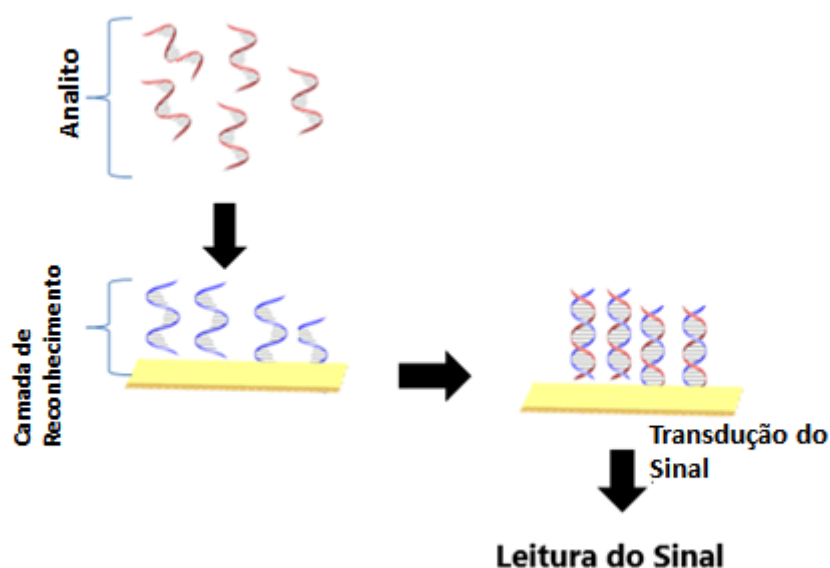
Transdutor	Tipo de Medida
Amperométrico	Corrente gerada pela oxidação ou redução das espécies eletroativas
Potenciométrico	Diferença do Potencial elétrico
Conduvimétrico	Variação da medida de condutância
Impedimétrico	Variação da Impedância

1.2.4.3 Biossensores Eletroquímicos de DNA

Técnicas de detecção de sequências de DNA como: PCR, eletroforese em gel, hibridação molecular e sequenciamento 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 (Labuda et al., 2010). Apresentam vantagens em comparação aos métodos tradicionais de detecção de DNA como: o baixo custo, a medida em tempo real, a rapidez e a seletividade (Mikkelsen, 2004; Berney et al., 2000; Pividori et al., 2000).

Os genossensores baseiam-se na detecção eletroquímica da hibridização das cadeias de DNA complementares que ocorre na superfície do eletrodo (Liu et al., 2012). O evento de hibridização ocorre entre uma sequência simples imobilizada na superfície do eletrodo e uma sequência alvo complementar presente em uma amostra em solução. Este processo gera uma reação eletroquímica de oxirredução na superfície transdutora que produz sinais analíticos mensuráveis (Figura 13) (Kleo et al, 2011).

Figura 13: Esquema de um genossensor. Fonte: Próprio autor .



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. O monitoramento também pode ocorrer de forma indireta pela modificação das propriedades interfaciais da superfície do eletrodo. Comparam-se os distintos comportamentos eletroanalíticos da sonda (ssDNA) e quando em contato com o alvo complementar (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).

Os biossensores de DNA podem ser classificados em dois grupos principais, os que utilizam marcações e os que não as utilizam (do inglês, *label-free*) (Ozsoz, 2012). Os genossensores *label-free* têm ampla vantagem na detecção de materiais genéticos em análises clínicas, pois simplificam os passos para a detecção, já que eliminam as etapas de marcação, o que reduz o tempo e o custo da análise. Neste tipo de detecção, a hibridização provoca alterações nas propriedades elétricas da superfície do eletrodo, tais como impedância (Pan, 2005), resistência (Li et al., 2005), e potencial (Ingebrandt et al., 2007) que podem ser mensuradas como sinal analítico.

Estes sensores são altamente sensíveis, de fácil manuseio, portátil e compatível com as atuais microtecnologias, principalmente pela real possibilidade de produção em massa. Os 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).

1.2.4.4 Biossensores para detecção de *Schistosoma* e *Leishmania*

Em razão da alta incidência e morbidade relacionadas a infecções por *S.mansoni* e *L. chagasi*, faz-se necessário o desenvolvimento de métodos diagnósticos, rápidos, sensíveis e seletivos para o diagnóstico destas patologias. A determinação destas infecções é importante tanto para a proteção da saúde quanto para a continuação do tratamento médico (Zhou, 2002).

São relatadas diversas pesquisas voltadas para o desenvolvimento de sensores baseados em anticorpos ou antígenos para a avaliação da Esquistossomose e Leishmaniose (Wu et al., 1999; Cheng et al., 2008; Lei et al., 2003; Ramos-Jesus et al., 2016; Souto et al., 2013). No entanto, alguns enfoques em genossensores são observados derivados da necessidade de avaliação mais precisa e sensível das parasitoses em destaque (Nazari-Vanani et al., 2018; Frias et al., 2017; Santos et al., 2019). Desta forma, uma série de sensores vem sendo desenvolvido usando tecnologias avançadas para obtenção de novas ferramentas diagnósticas para a esquistossomose e a leishmaniose.

Neste intuito, Wang e colaboradores buscaram desenvolver metodologias alternativas de diagnóstico rápido e sensível para a detecção dos agentes etiológicos da esquistossomose, dentre eles o *Schistosoma japonicum*. Para isto, foi elaborado um imunossensor piezoelétrico simples, sensível, e reutilizável baseado em monocamada automontada, utilizando-se uma mistura de ácido mercaptopropiônico e mercaptoetanol. Esta superfície mostrou-se ser útil na detecção de antígenos de *S. japonicum* diretamente do soro de pacientes infectados sendo alternativa para os métodos convencionais de diagnóstico. Várias amostras de soro de coelho infectadas com diferentes concentrações de anticorpos de *S. japonicum* foram analisadas por meio de imunossensor eletroquímico (Wang et al., 2012).

Uma importante estratégia para o diagnóstico precoce de *S. japonicum* parece ser a detecção direta dos antígenos. A avaliação dos antígenos torna-se essencial uma vez que, permite o diagnóstico precoce da Esquistossomose. O conhecimento atual desta infecção demonstra que infecções em 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). 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. O sistema piezoelétrico utilizado foi sensível a antígenos de cercarias sendo para 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 à 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 $15\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$, com um limite de detecção de $\sim 1.3\text{ ng mL}^{-1}$. Os resultados dos ensaios apontam para a viabilidade de aplicações práticas dos biossensores na detecção deste patógeno.

Biossensores eletroquímicos têm despertado grande interesse, pois é um método eficiente para diagnósticos clínicos e podem ser utilizados em ocasiões em que seja necessária a capacidade de monitoramento em tempo real (Pohanka e Skladal, 2008). Na Tabela 1 são listados principais biossensores desenvolvidos para a detecção do Schistosma.

Tabela 1: Principais biossensores desenvolvidos para detecção do Schistosoma.

Tipo de Biossensor	Parasita	Técnica	Limite de detecção	Referencia
Imunossensor	<i>S. japonicum</i>	QCM	5ng mL ⁻¹	Wu et al., 2006
Imunossensor	<i>S. mansoni</i>	Voltametria Cíclica	-	Bojorge et al., 2007
Imunossensor	<i>S. mansoni</i>	Voltametria cíclica	0.0038 ng mL ⁻¹	Shohayeb et al., 2016
Imunossensor	<i>Schistosoma sp</i>	voltametria de decapagem anódica	0.01 µg mL ⁻¹	Xu et al., 2010
Imunossensor	<i>S. japonicum</i>	Voltametria de decapagem	1.3 ng mL ⁻¹	Nie et al., 2012
Imunossensor	<i>Schistosoma sp</i>	UV/Vis fotometria e voltametria cíclica	3.31×10 ⁻⁵ ng mL ⁻¹	Odundo et al., 2016
Imunossensor	<i>S. japonicum</i>	voltametria de decapagem anódica	3.0 ng mL ⁻¹	Chu et al., 2005
Genossensor	<i>S.mansoni</i>	Voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica	(0.781) pg mL ⁻¹ (Soro) 0.685 pg mL ⁻¹ (LCR)	Santos et al., 2017
Genossensor	<i>S.mansoni</i>	Voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica	0.6 pg L ⁻¹	Santos et al., 2019

Em adição, ferramentas sensoras de diagnóstico também vêm sendo desenvolvidas para a detecção da Leishmaniose visceral, uma vez esta parasitose é uma importante causa de morbidade e mortalidade no Brasil para humanos e cães em regiões subdesenvolvidas. Por isso novos métodos de diagnóstico são cada vez mais necessários para favorecer o diagnóstico e, por conseguinte o tratamento adequado. Por este motivo, Nazari-Vanani e colaboradores (2018) desenvolveram uma estratégia analítica específica para detecção sensível do genoma

de *Leishmania infantum*. O sensor desenvolvido utilizou o azul de toluidina como indicador de hibridação e uma sequência de DNA de captura específica de *Leishmania infantum* imobilizada em uma nanoestrutura de ouro de alta área superficial como um transdutor eletroquímico. O sensor de DNA poderia detectar o genoma de *Leishmania infantum* em uma ampla faixa de concentração de 15 a 50ng μL^{-1} com um limite de detecção de 29ng μL^{-1} . Além deste trabalho podemos destacar que esforços vêm sendo empregados visando o desenvolvimento de novas e eficazes metodologias de detecção das leishmanioses. A tabela 2 demonstra alguns exemplos de biossensores para detecção de *Leishmania* que vem sendo desenvolvidos nos últimos anos.

Tabela 2: Biossensores para detecção de *Leishmania*

Tipo de Biossensor	Parasita	Técnica	Limite de detecção	Referencia
Genossensor	<i>L. donovani</i>	Voltametria de pulso diferencial	2 pg. mL^{-1}	Mohan et al., 2011
Imunossensor	<i>L. infantum</i>	QCM	1.8×10^4 amastigotas/g	Cabral-miranda et al., 2014
Genossensor	<i>L. major</i>	Voltametria cíclica	0.07 ng mL^{-1}	Moradi et al., 2016
Imunossensor	<i>L. amazonensis</i>	Espectroscopia de Impedância Eletroquímica	10^{-5} mg mL^{-1}	Perinoto et al., 2010
Imunossensor	<i>L. infantum</i>	Fotoeletroquímica	0.05nM	Neto et al., 2017

Desta forma, o desenvolvimento de biossensores para a detecção do *Schistosoma* e da *Leishmania* tem se mostrado uma ferramenta bastante promissora para a detecção precisa e precoce destas patologias. O uso de nanoestruturas é uma importante estratégia para o melhoramento no desempenho destes dispositivos, dentre elas destacamos as nanopartículas de ouro devido as suas propriedades que serão exploradas adiante.

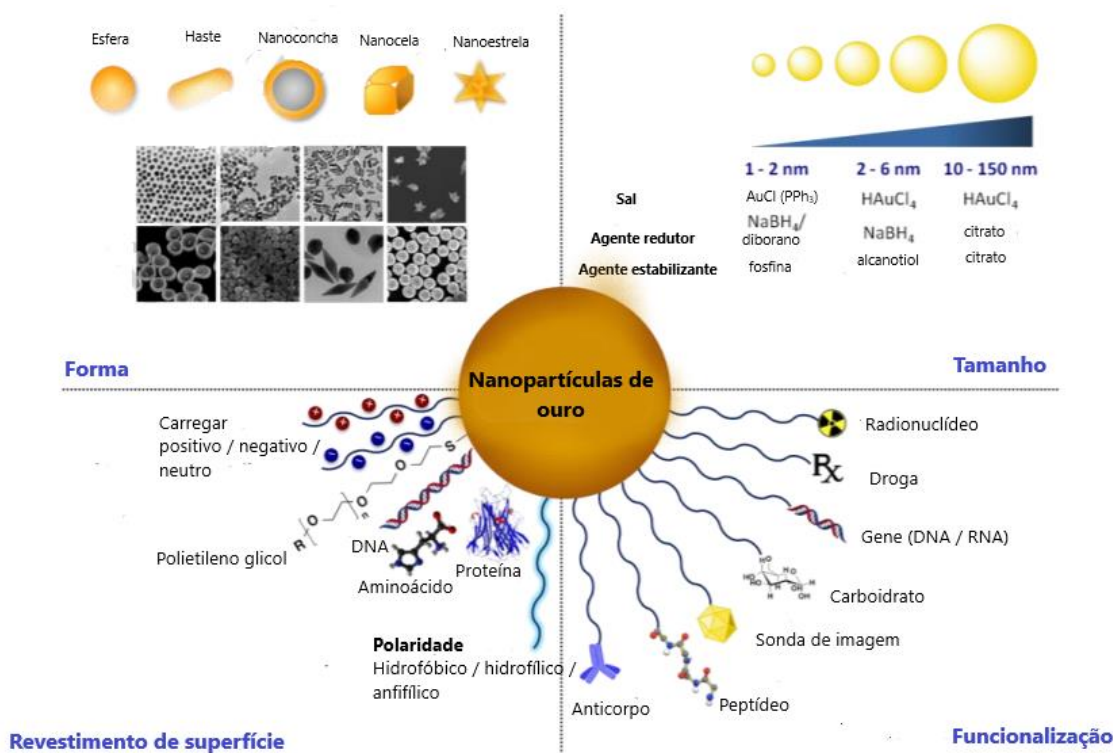
1.2.5 Nanopartículas de Ouro

Um esforço intenso tem sido feito no campo da ciência analítica, visando o desenvolvimento de materiais em escala nanométrica e suas propriedades intrínsecas. Entre os

nanomateriais, o ouro tem um papel especial. Muitos procedimentos sintéticos podem ser encontrados na literatura para controlar o tamanho, a monodispersão, a morfologia e a química superficial das nanopartículas de ouro (Figura 14). A fácil modificação da superfície do ouro por moléculas terminadas por tiol o torna adequado para muitas montagens biológicas diferentes (Vidotti et al, 2011).

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 e também facilitam a transferência eletrônica além de facilitar a imobilização de agentes biológicos (Kouassi et al., 2005; Arteaga et al., 2010; Kaushik et al., 2008).

Figura 14: Versatilidade das Nanopartículas de Ouro. Fonte Her et al., 2015. Adaptado.



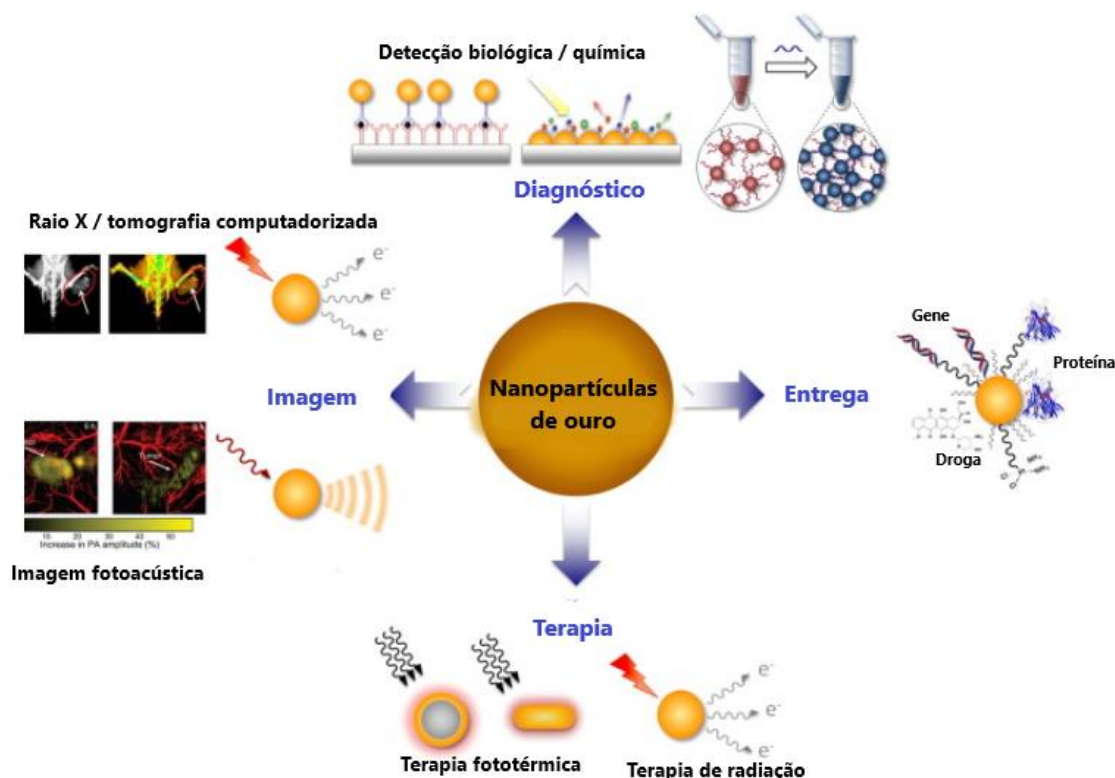
As nanoestruturas apresentam várias vantagens em ciências analíticas quando usadas como transdutores ou como componente da camada de reconhecimento em um dispositivo de

detecção. As propriedades intrínsecas de NPsAu, quando utilizadas como transdutores são: melhoria no transporte em massa, maior disponibilidade de sítios reacionais, efeito óptico de agregação / dispersão e aumento do sinal óptico devido a propriedades ressonantes de plásmon de superfície de tais nanopartículas. Aproveitando a versatilidade sintética combinada com o exclusivo sistema ótico e as propriedades eletrônicas do Au, as NPsAu podem ser exploradas para uma ampla variedade de aplicações biomédicas, incluindo imagens (por exemplo, tomografia computadorizada, imagem fotoacústica, espalhamento Raman intensificado por superfície), distribuição por exemplo, drogas, genes, pequenos interferentes RNAs e terapias fototérmica, radiosensibilização, bem como a inclusão em plataformas de diagnóstico por exemplo, sensoriamento biológico e químico (Mieszawska et al., 2013; Rana et al., 2012; Saha et al., 2012). Alguns exemplos de aplicações biomédicas de NPsAu são demonstradas na figura 15.

No caso de uso como elemento de biorreconhecimento, a melhoria da resposta do biossensor pode ser alcançada pelo aumento da relação área / volume que aumenta o número de biocomponentes anexados na superfície detectora. 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 biossensoriamento (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 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). Além de que, as propriedades redox de NPsAu levaram ao seu uso extensivo em biossensores eletroquímicos para detecção de ácido nucleico e outras moléculas, com numerosas configurações sendo exploradas (Pingarrón et al., 2008).

Figura 15: Algumas aplicações biomédicas das Nanopartículas de ouro. Fonte: Her et al., 2015. Adaptado.



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. (Loaiza et al., 2011; Salehizadeh et al., 2012). Neste sentido, o ouro proporciona a estabilidade química adequada para a funcionalização de oligonucleótidos (Qiu et al., 2010; Loaiza et al., 2011). Podemos destacar ainda que a superfície do ouro é de fácil funcionalização com moléculas via ligações covalentes (Lyon et al., 2004).

1.2.5.1 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). 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 sendo uma promissora ferramenta para o diagnóstico precoce de diferentes patologias.

As propriedades físicas e químicas únicas dos materiais nanoestruturados fornecem excelentes perspectivas para a interface de eventos de reconhecimento biológico com transdução de sinal eletrônico e para projetar uma nova geração de dispositivos bioeletrônicos com novas funções (Guo e Wang, 2007). O desenvolvimento de materiais com características melhoradas para aplicações bioanalíticas desperta o interesse no desenvolvimento de partículas usadas em bioensaios (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 (Chen et al., 2011; Zhang et al., 2008). De acordo com essas propriedades, a presença de um agente patogênico em amostras clínicas ou ambientais pode ser facilmente detectada (Kaittanis e Perez, 2010).

As nanopartículas têm sido muito frequentemente usadas no desenvolvimento de biossensores de DNA (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 (Du et al., 2009; Gao et al., 2018; Sun et al., 2015; Chen et al., 2016).

1.2.6 Modificação da Superfície do Transdutor

1.2.6.1 Eletrodeposição

A eletrodeposição é um processo eletroquímico que permite a formação de depósitos sólidos sobre a superfície de um material condutor (Pasa et al., 2006). Esta técnica permite a deposição de uma camada formando um revestimento metálico sobre um material base via redução eletroquímica de íons metálicos a partir do eletrólito. O eletrólito é um condutor

iônico onde espécies químicas, contendo o metal de interesse, estão dissolvidas num solvente adequado (Gamburg; Zangari, 2015).

As reações eletroquímicas envolvem estímulos elétricos externos, promovendo a transferência de cargas elétricas através da interface eletrodo/eletrólito. Desta forma, o método de eletrodeposição se dá quando há a imersão da superfície a ser coberta em um recipiente contendo o eletrólito e o contra eletrodo, seguida pela ligação dos dois eletrodos em uma fonte de alimentação externa, para que ocorra o fluxo da corrente. O objeto a ser coberto é conectado no terminal negativo da fonte de alimentação, assim os íons metálicos são reduzidos para os átomos do suporte condutor, formando o depósito na superfície (Gamburg; Zangari, 2015).

A deposição eletroquímica ou eletrodeposição está baseada nas reações de oxi-redução. Durante as reações redutoras ocorre à transferência de elétrons do eletrodo para o eletrólito (deposição catódica) e durante as reações oxidantes ocorre à transferência de elétrons do eletrólito para o eletrodo (deposição anódica). Os processos de eletrodeposição geralmente ocorrem em uma célula eletroquímica contendo os eletrodos e a solução eletrolítica, os eletrodos são ligados a uma fonte externa que os carrega com cargas opostas, formando o potencial elétrico, que por sua vez determina o movimento dos íons presentes no eletrólito (Pasa et al., 2006).

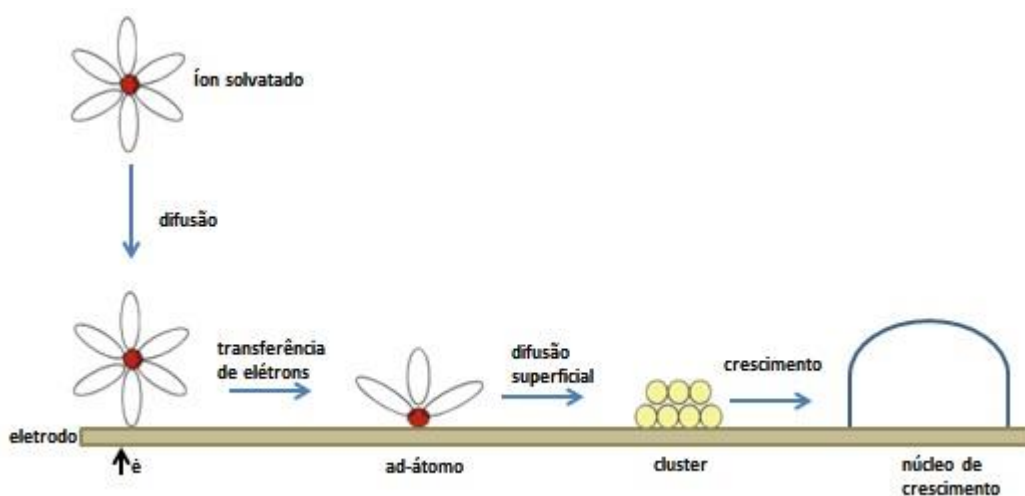
A voltametria cíclica é utilizada para estudar o comportamento da solução eletrolítica na presença de um campo elétrico aplicado e para identificar os valores de potenciais em que ocorrem as reações de redução e de oxidação. Ela apresenta o desempenho eletroquímico da interface eletrodo/eletrólito (Stenger, 2008) e é obtida pelo controle e registro da variação de potencial que ocorre entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência e pela medida e registro da corrente elétrica que flui entre o eletrodo de trabalho e o contra eletrodo.

As principais etapas do procedimento de eletrodeposição são: difusão do íon dissolvido na solução na direção do eletrodo de trabalho, posteriormente a transferência de elétrons dando início ao processo de adsorção e por fim a difusão superficial com incorporação à superfície do eletrodo (Pasa et al., 2006). A Fig. 16 mostra a representação esquemática das etapas de crescimento da camada eletrodepositada.

A obtenção de nanopartículas pelo método eletroquímico apresenta vantagens, tais como: aumento da condutividade do eletrodo, facilidade de transferências de elétrons e

melhora da sensibilidade analítica e seletividade (Oliveira et al., 2016). O crescente uso da eletrodeposição deve-se, também, a vantagens apresentadas pelo método, quando comparadas a técnicas comumente aplicadas, tais vantagens são: instrumentação de baixo custo, possibilidade de obtenção de depósitos em diferentes formas, microestrutura, composição e espessura desejada além de taxa de crescimento elevada (Lincot, 2005).

Figura 16: Representação do mecanismo de deposição na superfície do eletrodo onde se pode observar a difusão do íon solvatado na solução e em direção ao eletrodo de trabalho, transferência de elétrons iniciando a adsorção (ad-átomo) e difusão superficial com incorporação à superfície do eletrodo. Fonte: Nasirpour, 2016; Silva, 2004. Adaptado.



A técnica de eletrodeposição do ouro é utilizada na modificação de eletrodos, pois além de ser um excelente condutor, dependendo das condições de síntese é possível obter materiais com diferentes formas e tamanhos, que podem influenciar na atividade eletroanalítica (Shu et al., 2014; Ma et al., 2010).

1.2.6.2 Monocamadas Automontadas

Uma metodologia bastante empregada no desenvolvimento de biossensores nanoestruturados é a modificação da superfície transdutora por meio da formação de monocamadas automontadas (Self Assembled-Monolayers, SAMs) (Arya et al., 2009). Este tipo de modificação pode ser definido como filmes de espessura monomolecular, com um alto

grau de organização e são formadas espontaneamente quando uma superfície sólida é imersa em uma solução com moléculas anfóteras (Freire et al., 2003; Benites et al., 2014). Estes filmes despertam grande interesse em áreas como a de diagnósticos clínicos. Uma variedade de materiais tais como: superfície de platina, ouro, prata, cobre e de moléculas anfóteras, por exemplo: derivados alquil, álcoois, aminas, tióis entre outros têm sido empregados na composição destes sistemas organizados (Freire et al., 2003).

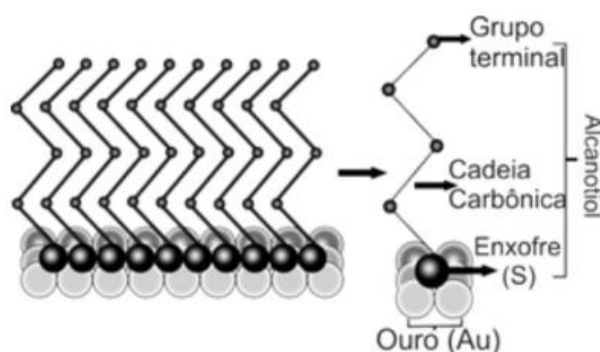
As monocamadas automontadas são altamente estáveis, sensíveis, reprodutíveis e organizadas (Arya et al., 2009; Morf et al., 2006). São formadas por moléculas orgânicas que podem conter grupos terminais específicos com propriedades que podem ser modificadas e facilmente manipuladas. A adsorção da molécula 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).

Usualmente, monocamadas automontadas são formadas a partir de uma solução aquosa ou orgânica contendo tiol sobre a superfície metálica de ouro. Esse tipo de modificação apresenta inúmeros benefícios experimentais, associada outras vantagens como a facilidade de manejo e baixo custo no preparo, acessibilidade e estabilidade (Benites et al., 2014; Chaki et al., 2001). Normalmente, as SAMs são formadas a partir da funcionalização de superfícies limpas de ouro com moléculas de alcantóis, devido a grande afinidade do enxofre pelos átomos de ouro, que formam uma ligação forte entre si. Desta forma, as cadeias carbônicas que formam as moléculas se atraem devido às atrações eletrostáticas fracas entre as cadeias de alquil e geram uma organização espontânea entre elas, estabilizando e orientando os átomos que as compõem, construindo assim um filme monomolecular (Benites et al., 2014). (Figura 17).

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. As SAMs agem como elemento de ligação entre eletrodo e amostras biológica, uma vez que sua formação permite o entendimento dos sinais advindos das interações biológicas por meio de superfícies ligadas a equipamentos capazes de realizar leituras físico-químicas (Freire et al., 2003; Mena et al., 2005; Campuzano et al., 2006; Benites et al., 2014).

Figura 17: Representação esquemática de uma monocamada automontada mostrando a modificação de uma superfície de ouro com alcanotiol e sua estrutura unitária molecular. Fonte: Benites et al., 2014.



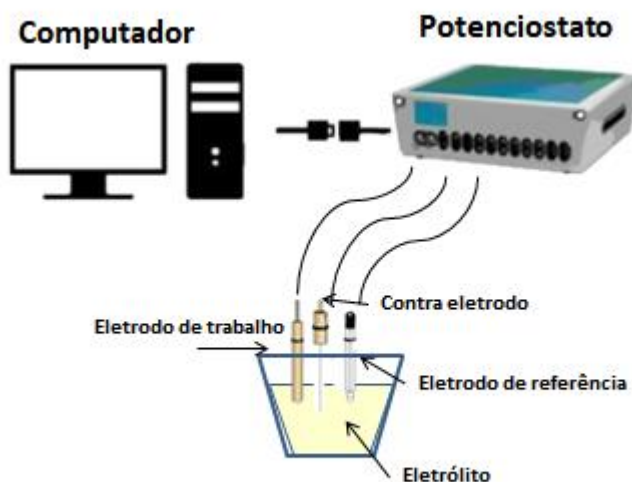
As técnicas eletroanalíticas mais comumente utilizadas para caracterização elétrica das SAMs são a voltametria cíclica (VC) e a espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE). A principal vantagem vinculada a elas é que são formas de análise de excelente custo-benefício, fácil manuseio, o procedimento experimental é estável para as condições ambientais naturais e, além disso, são capazes de fornecer inúmeras informações sobre as características físico-químicas da superfície como a cinética de formação das SAMs, a transferência eletrônica através de uma superfície modificada e muitas outras (Chaki et al., 2001; Eckermann et al., 2010). Por este motivo, foram as técnicas utilizadas do desenvolvimento deste estudo.

1.2.7 Técnicas Eletroanalíticas

As técnicas eletroanalíticas utilizam propriedades elétricas mensuráveis como: corrente elétrica, diferença de potencial e acúmulo interfacial de cargas que ocorrem na superfície do eletrodo durante um processo físico e/ou químico para obter informações analíticas. Estes processos podem ocorrer espontaneamente ou quando se aplicam perturbações controladas ao sistema (Pacheco et al., 2013).

Geralmente, as análises eletroquímicas são feitas em uma célula eletroquímica de três eletrodos nomeados de eletrodo de trabalho, sensível ao analito, eletrodo de referência, para controle do potencial, e eletrodo auxiliar para controle da corrente (Bard & Mirkin, 2001). Os fenômenos oxidação-redução ocorrem na interface entre a solução contendo o eletrólito e a amostra a ser analisada e a superfície do eletrodo de trabalho. O eletrólito tem função de assegurar a condutividade elétrica do meio e garantir força iônica adequada e constante. A corrente gerada deve fluir para o eletrodo auxiliar, usualmente de platina. O eletrodo de referência contribui com um potencial constante e conhecido e é utilizado para monitorar o potencial do eletrodo de trabalho, comumente são utilizados os de prata com cloreto de prata para este fim (Pacheco et al., 2013; Wang, 2006b; Otles, 2016). Uma representação esquemática de uma célula eletroquímica usual de três eletrodos é mostrada abaixo:

Figura 18: Representação esquemática de uma Célula eletroquímica contendo uma solução eletrolítica e um conjunto de eletrodos (Eletrodo de Trabalho, Contra eletrodo e Eletrodo de Referência conectados a um potenciostato/galvanostato. Fonte: Próprio autor.



O potenciostato é utilizado para aplicar o potencial e fazer as medidas da corrente, além de isolar o eletrodo de referência eletricamente, impedindo a passagem de corrente entre ele e o eletrodo de trabalho, enquanto favorece a passagem de corrente entre este e o eletrodo auxiliar. À medida que o potencial se torna negativo, o eletrodo se torna fonte de elétrons favorecendo a redução das espécies na interface eletrodo-solução, enquanto potenciais

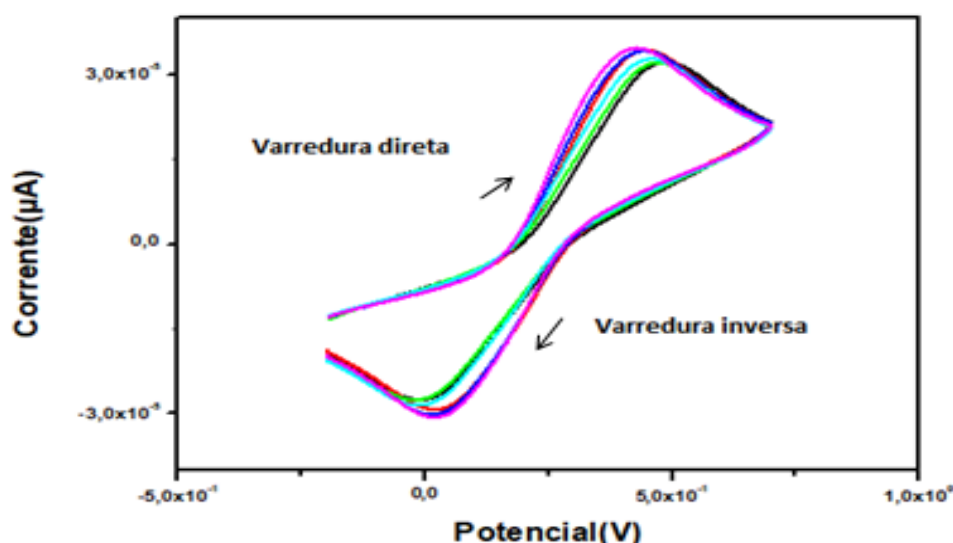
positivos favorecem a oxidação de espécies na superfície (Pacheco et al., 2013; Li; Miao, 2013).

1.2.7.1 Voltametria Cíclica

A voltametria é uma técnica eletroquímica baseada na medição das correntes geradas em função de uma dada programação de potenciais impostos em um eletrodo imerso em um eletrólito. Se o potencial aplicado no eletrodo for deslocado para uma região na qual o eletrodo seja capaz de reduzir ou oxidar algum componente do eletrólito a corrente fluirá. Esta técnica fornece informações acerca da espécie eletroativa baseada nos registros de curvas de corrente em função de um potencial aplicado durante o processo eletroquímico podendo fornecer informações qualitativas e quantitativas, incluindo informações da cinética de transferência eletrônica das reações, processos termodinâmicos e reações químicas acopladas a processos adsortivos (Li; Miao, 2013; Pacheco *et al.*, 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 (Figura 19), 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. A corrente originada pode ser proporcional à concentração do analito, demonstrando que a técnica pode ser utilizada como um método analítico quantitativo (Skoog et al., 2002; Harris, 2005; Otles, 2016).

Figura 19: voltamogramas cíclicos de uma solução $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$ de diferentes concentrações de DNA_{alvo} em eletrodos de ouro. Fonte: Próprio autor.

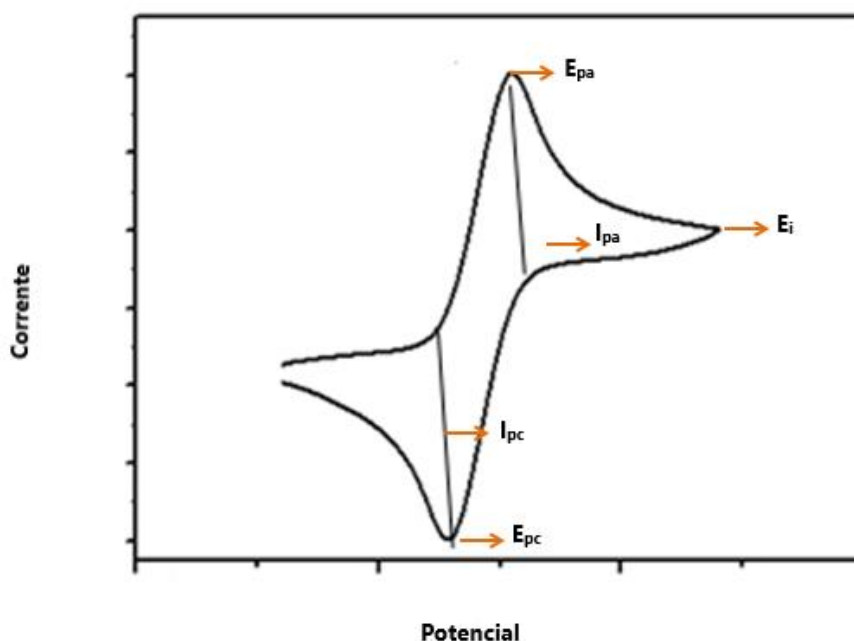


Com o varrimento linear um composto da solução é eletrolisado, sofrendo oxidação ou redução, através da alteração do potencial na superfície do eletrodo de trabalho, o que torna a superfície suficientemente positiva ou negativa para receber ou transferir elétrons na análise da solução (Brett, 1993). Parâmetros importantes que são fornecidos pela curva voltamétrica nos processos de oxidação e de redução são representados por correntes de pico anódica (ipa) e catódica (ipc). Além destas, outras 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 20 representa um típico voltamograma cíclico com seus principais parâmetros.

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 ocorra 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 & Faulkner, 2001).

Figura 20: 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). Fonte: próprio autor



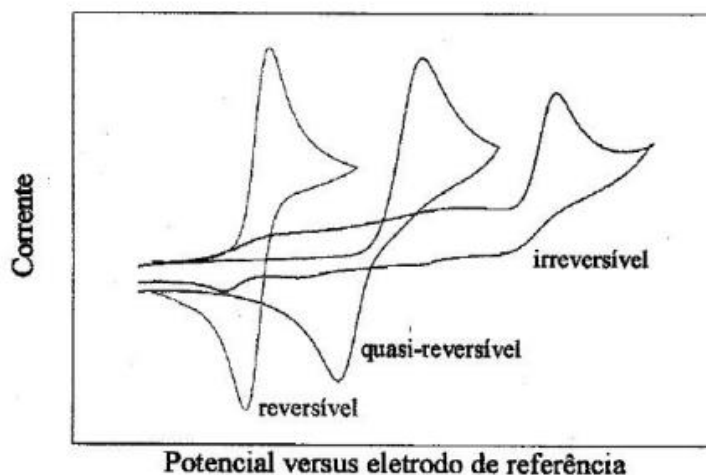
A voltametria cíclica é uma ferramenta bastante utilizada para adquirir informações qualitativas sobre processos eletroquímicos. A eficiência desta técnica se deve a sua característica de rapidamente fornecer informações sobre a termodinâmica de processos redox, da cinética de reações heterogêneas de 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 quase-reversível como ilustrado na Figura 21 (Wang, 2000; Silva, 2010).

Em sistemas reversíveis, a velocidade de transferência de elétrons é maior que a taxa de transferência de massa. Um equilíbrio dinâmico é estabelecido na interface do eletrodo/solução devido à 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 2006b).

Figura 21: Diferentes reversibilidades de sistemas avaliados por voltametria cíclica: sistema reversível, quase-reversível e irreversível. Fonte: Fisher, 1996.



Nos sistemas quase-reversíveis, 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 2006b).

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, 2006b).

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).

A voltametria é uma técnica bastante vantajosa, já que permite a relação direta entre a concentração da amostra em análise e a intensidade de corrente; análise de amostra sem prévia purificação; análise de substâncias coloridas ou contendo partículas sólidas dispersas; reduzido custo de instrumentação e dos materiais utilizados assim como alta sensibilidade quando comparadas às técnicas cromatográficas e espectroscópicas e cromatográficas; eficácia na detecção de baixas concentrações e rapidez na realização das análises (Souza et al., 2003; Wang, 2006b; Otles, 2016). Estas vantagens mostram a importância da aplicação da voltametria em diferentes áreas do conhecimento.

1.2.7.2 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

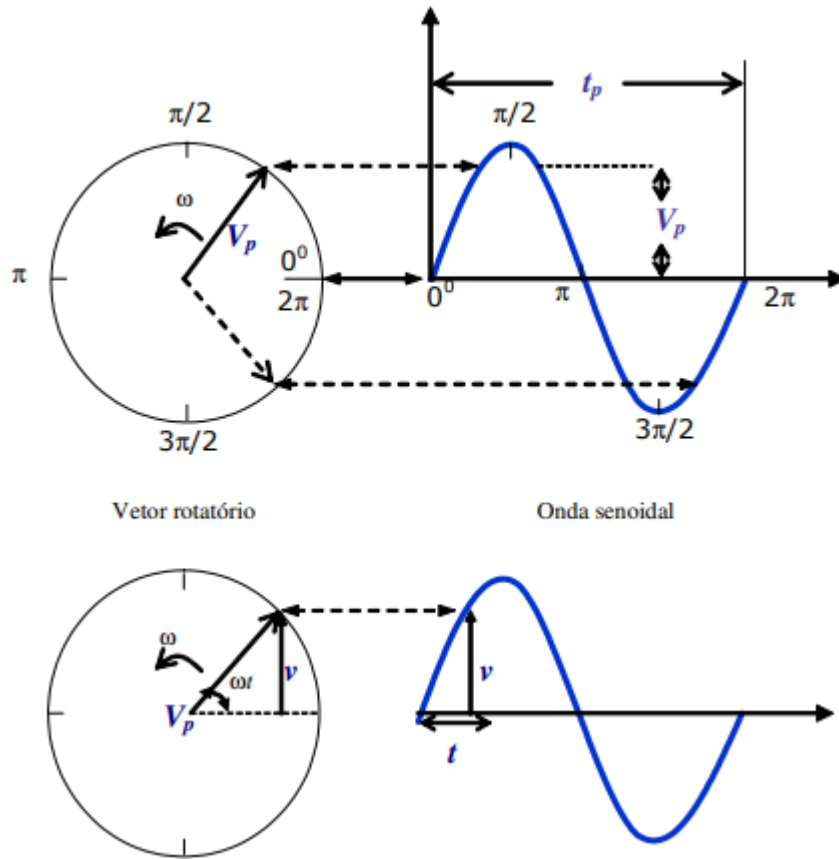
A espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) é uma técnica empregada para obter informações relacionadas às características eletroquímicas de um sistema. Como a resistência a transferência de carga (R_{ct}), a impedância de difusão (Z_w), a capacitância da dupla camada (C_{dl}) e a resistência da solução (R_s). A EIE tem sido bastante empregada no estudo de mecanismos de eletrodeposição, eletrodissolução, estudos de interface de semicondutores, filmes poliméricos e biossensores. O fundamento do método é a aplicação de um estímulo elétrico, isto é, um potencial ou corrente conhecida, e a observação da resposta gerada (em corrente ou potencial) partindo-se da condição de que suas propriedades são invariantes com o tempo (Macdonald e Johnson, 2005).

A Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE) é uma técnica baseada na aplicação de um estímulo elétrico contínuo e fixo, ou seja, 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 observar a impedância frente à 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 número grande de processos intercorrelacionados ocorre em diferentes velocidades (Silva, 2010; Carvalho et al., 2006).

Usualmente, em biossensores impedimétricos o potencial empregado é baixo, não ultrapassando 10 mV, pois apenas em perturbações tão pequenas pode ser estabelecida uma relação linear entre a corrente e o potencial, obtendo-se assim uma impedância bem definida. Além disso, a camada de biorreconhecimento do dispositivo apresenta energias de ligação que podem ser covalentes (1 – 3 eV) ou de natureza menos energética, assim um potencial elevado aplicado poderiam remover essa camada do sensor (Daniels e Pourmand, 2007; Barbero, Alexeionescu e Lelidis, 2005). É uma técnica que fornece informações completas e detalhadas das características elétricas da interface eletrodo/solução, em sistemas formados por capacitância, resistência e indutância, estendendo-se ainda aos sistemas eletroquímicos, uma vez que diversos processos podem influenciar a relação entre a corrente e o potencial do sistema (Shervedani et al., 2007; Arotiba et al., 2007).

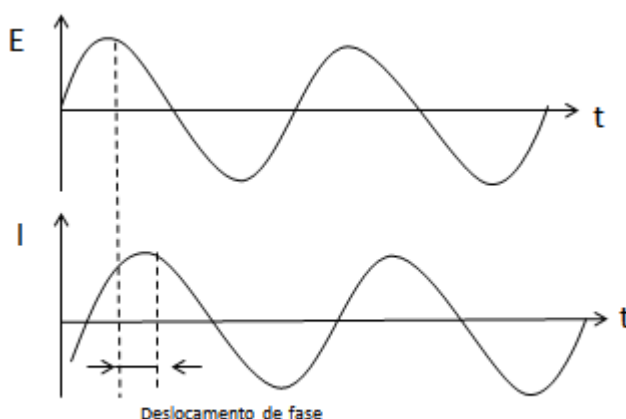
As correntes e tensões em grande parte dos circuitos não são estacionárias, variando com o tempo. A forma mais simples de variação de tensão (ou corrente) com o tempo é a forma senoidal, que é representada por um vetor comprimento V_p (ou I_p), também conhecido como valor máximo de tensão (ou corrente), e que gira em sentido anti-horário com velocidade angular constante ω . A onda senoidal é geralmente é medida em termos de medida angular, no entanto, também pode ser mensurada em uma base temporal (Martins-Junior, 2007). A figura 22 mostra a representação do vetor e o gráfico da onda senoidal.

Figura 22: Representação de uma onda senoidal de período t_p e amplitude I_p e sua relação entre a representação do correspondente vetor de comprimento I_p girando em sentido anti-horário a uma velocidade angular constante de $\omega = 2\pi f$ radianos/segundo ou uma frequência de f Hz. Fonte: Martins-Junior, 2007.



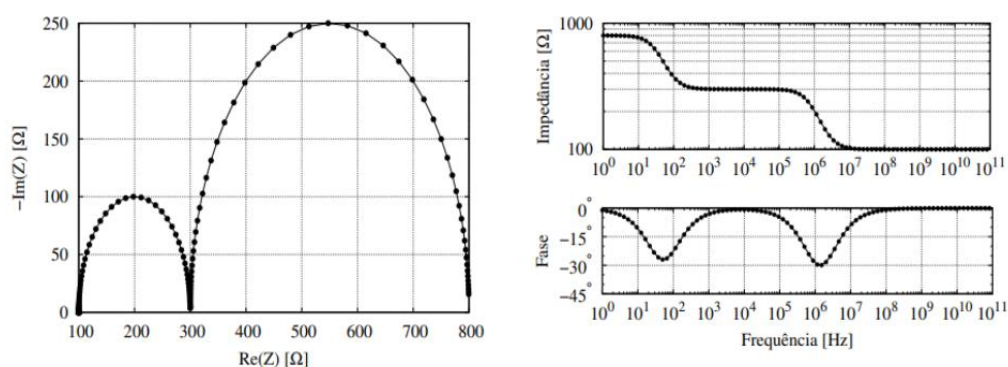
Em resumo, nesta técnica surge uma corrente de natureza senoidal em consequência a aplicação de um potencial senoidal ao sistema. Duas ondas senoidais que têm amplitudes diferentes também podem estar em fases diferentes. Ou seja, os valores máximos e picos e zeros das ondas não ocorrem necessariamente ao mesmo tempo, o deslocamento de fase entre potencial e corrente é mostrado na figura 23. A diferença de fase é chamada de ângulo de fase, que surge pelo fato de um vetor se adiantar ou se atrasar em relação ao segundo (Martins-Junior, 2007).

Figura 23: Resposta senoidal de corrente elétrica frente a uma perturbação de potencial. Fonte: Próprio autor



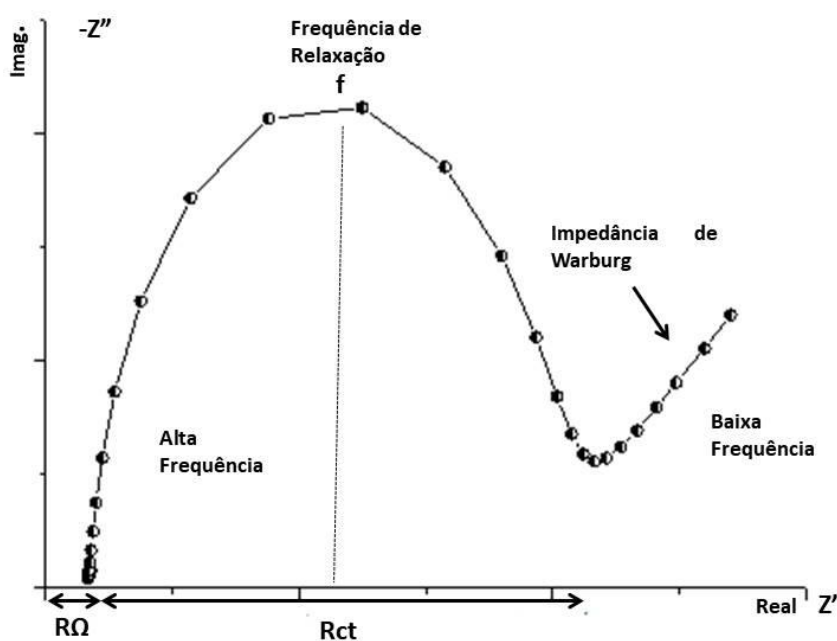
Os dados de impedância podem ser representados de diferentes maneiras, sendo as representações gráficas mais comuns o diagrama de Bode ($|Z|$ e ϕ vs. $\log(\omega)$) e o diagrama no plano complexo (Z' vs. Z''), também conhecido como diagrama de Argand-Gauss, Nyquist ou Sluyters que será utilizado para análise dos resultados de impedância deste trabalho. O diagrama de Nyquist (plano complexo) é composto da parte real no eixo das abscissas e da parte imaginária, no eixo das ordenadas, num plano cartesiano em diferentes frequências. Deste modo, cada ponto deste tipo de gráfico representa a impedância a uma dada frequência. Já na representação através do diagrama de Bode, o módulo de impedância, $|Z|$, e o ângulo de fase ϕ são representados em função do logaritmo da frequência angular ω (Barsoukov & Macdonald, 2005). A Figura 24 mostra as representações de Nyquist e de Bode para um circuito série/paralelo de duas constantes de tempo usualmente encontrado no modelamento de sistemas eletroquímicos.

Figura 24: Representação da impedância complexa em função da frequência no (a) plano complexo, e em (b) magnitude e fase. Fonte: Chiappetta-Filho, 2014.



No diagrama de Nyquist o eixo das abscissas corresponde à parte real, é medida em ohm (Ω) e equivale às contribuições de resistências. O eixo das ordenadas corresponde à parte imaginária também em ohm (Ω) e está relacionado às contribuições indutivas e capacitivas da impedância. Os valores de impedância são concebidos em uma faixa de frequências e gera configurações típicas, de acordo com o mecanismo eletroquímico predominante. Desta forma, a técnica se mostra como uma ferramenta importante para separar processos que ocorrem na interface metal/solução em um sistema eletroquímico, já que na maioria das técnicas eletroquímicas tradicionais seriam vistos como contribuições simultâneas à resposta total (Crow, 1994; Orazem, 2008; Barsoukov & Macdonald, 2005). A figura 25 ilustra um gráfico de Nyquist.

Figura 25: Representação esquemática de um diagrama de nyquist. Fonte: próprio autor.



No diagrama de Nyquist acima podemos observar duas regiões distintas, uma de controle cinético de alta frequência, e outra de controle de transporte de massa, de baixa frequência. A região de alta frequência é formada por um semicírculo, o qual o diâmetro equivale aos valores de $R\Omega$ e R_{ct} . A região de baixa frequência é controlada pelo transporte

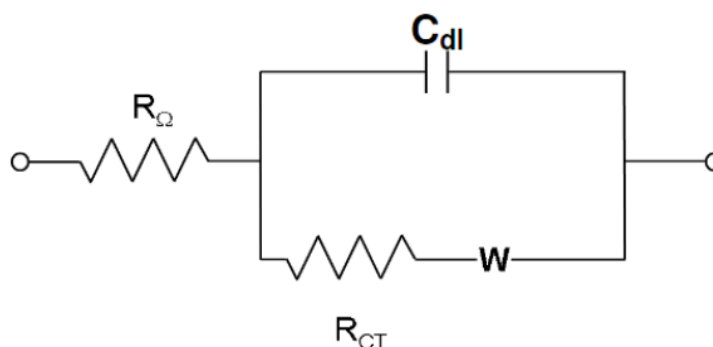
de massa e é representada pela parte linear do gráfico, onde se observa a impedância de Warburg. Além disso, dois parâmetros são obtidos da análise do semicírculo: RCT que é a medida do diâmetro e a frequência de relaxação característica, f , obtida no valor máximo do semicírculo. (Stevanatto et al., 2014)

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). Vários fenômenos eletroquímicos, como a presença da dupla camada elétrica na interface eletrodo-solução, corrosão de um material, formação de filme de óxido e adsorção na superfície do eletrodo, resistência da solução, resistência à transferência de carga, processos difusionais, além de muitos outros, podem ser representados por elementos de circuito (Cesiulis et al., 2016).

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 26), e é bastante útil para a análise da impedância causada por uma reação de óxido-redução em uma interface eletrodo-solução (Pejcic, 2006). O circuito corresponde a um resistor R_{Ω} acoplado em série à Rct e ao elemento de Warburg. Os dois últimos por sua vez estão acoplados em paralelo com um capacitor Cdl.

Figura 26 : Circuito equivalente de Randles para uma interface eletrodo\solução.



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.

O componente $R\Omega$ está relacionado à resistência da solução, o Rct e o ZW estão relacionados à difusão dos íons em solução e a difusão do par redox estudado. A capacitância da dupla camada elétrica é representada por Cdl por possuir a característica de capacitor (Grieshaber et al., 2008; Damos et al., 2004).

A utilização da técnica de EIE pode ser utilizada nas análises do processo de hibridização de oligômeros de DNA, por meio do monitoramento da variação da impedância total do sistema. Isto é possível, pois a impedância total do sistema está relacionada ao aumento da componente capacitiva do sistema, que por sua vez, é resultante de mudanças na densidade e mobilidade de íons associados com a reação de hibridização (Guisseppi-Elie; Gheorge, 2004). Neste sentido, Mahadhy et al. desenvolveram um estudo de um sensor capacitivo para monitorar a captura de ácidos nucleicos complementares de fita simples. Um oligonucleotídeo foi imobilizado na superfície do eletrodo de ouro modificado com politramina. A temperatura foi aumentada para 50 ° C para reduzir a hibridização não específica (Mahadhy et al., 2016). Em outro estudo, Mahadhy et al. desenvolveram um promissor genossensor portátil, ultrasensível, automatizado e baseado em fluxo. O biossensor dispensa o uso da PCR e provou a possibilidade de uma poderosa detecção de patógenos de origem alimentar e bactérias resistentes a vários medicamentos em um futuro próximo (Mahadhy, 2015).

Em alguns trabalhos a capacitância pode ser utilizada para se obter informações acerca da conformação e/ou orientação das proteínas. Neste sentido, Berggren e colaboradores prepararam um biossensor capacitivo para detecção de anticorpos e antígenos de proteína, fragmentos de DNA e íons de metais pesados e modificando a superfície pela técnica de SAMs (Berggren et al., 1998). Um sensor semelhante foi constituído para a detecção de *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium* em eletrodos de ouro, que foram funcionalizados (Laczka et al., 2008).

Os biossensores impedimétricos também se destacam como ferramentas importantes no desenvolvimento de técnicas de detecção biológica. Nesta perspectiva, Gong e colaboradores

(2017) desenvolveram um genossensor impedimétrico label free para detecção do vírus da imunodeficiência humana (HIV), através da modificação de um eletrodo de carbono vítreo com um filme de grafeno e Nafion®. A variação do Rct foi utilizada como parâmetro para o acompanhamento de cada etapa de modificação do genossensor. Esse biossensor impedimétrico pode detectar o gene do vírus HIV na faixa de $1,0 \times 10^{-13}$ a $1,0 \times 10^{-10}$ mol L⁻¹, com LOD de $2,3 \times 10^{-14}$ mol L⁻¹.

A EIE também pode ser utilizada no desenvolvimento de imunossensores. Assim, Fanga e colaboradores imobilizaram o vírus da dengue pré-inativado sobre as superfícies de filmes finos de titanato de bário e estrôncio (BST) preparados pelo método solgel modificados com monocamadas orgânicas formadas por 3 aminopropiltrietoxissilano (APTS). A superfície do sensor modificado serviu como teste de detecção seletiva para capturar/conjugar as moléculas de anticorpos da dengue presente no soro do paciente. Medidas de espectroscopia de impedância foram aplicadas para identificação da presença de anticorpos da dengue no soro (Fanga et al., 2010).

As técnicas eletroanalíticas se destacam, pois proporcionam múltiplas vantagens quando comparadas as técnicas existentes utilizadas na construção de biossensores como seletividade, especificidade, reprodutibilidade, precisão, tempo de resposta excelente e estabilidade química o que possibilita sua aplicação em diversas áreas.

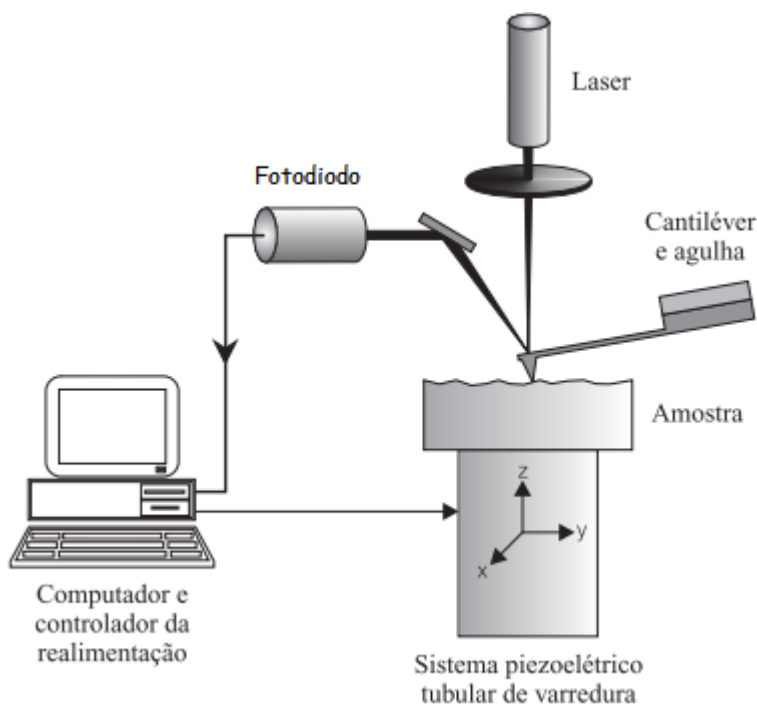
1.2.8 Microscopia de Força Atômica

Atualmente, existe uma família de microscópios de varredura por sonda ou SPM (*do inglês Scanning Probe Microscope*) entre os quais é possível citar o Microscópio de Tunelamento ou STM (*do inglês Scanning Tunneling Microscope*) e o Microscópio de Força Atômica ou AFM (*do inglês Atomic Force Microscope*). Essa classe de microscópios tem como componente essencial uma ponta ou sonda que varre a superfície da amostra detectando mudanças em seu relevo através de variações de grandezas físicas que dependem da variante do SPM escolhida (Pinto et al., 2013). A microscopia de força atômica tem recebido uma grande quantidade de estudos e investimentos, devido a sua maior resolução e menor custo comparado às microscopias eletrônicas de varredura (SEM) e de transmissão (TEM) (Ferreira; Yamanaka, 2006).

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 biofísico-químicos envolvidos, constituindo-se em mais uma ferramenta auxiliar de análise e proporcionando um rápido desenvolvimento interdisciplinar (Ferreira e Yamanak, 2006). Assim, é possível se obter novas informações sobre as bases moleculares dos processos biológicos, como por exemplo, a investigação de biofilmes bacterianos com superfícies metálicas em sistemas industriais, situações clínicas e adsorção de moléculas proteicas em superfícies de biomateriais.

O princípio de funcionamento do AFM está baseado na interação que ocorre, ao longo da varredura, entre os átomos que compõem a ponta do microscópio e os átomos que compõem a superfície da amostra. No decorrer da varredura, o cantiléver sofre deflexões devido à interação atômica, desviando o laser que incide sobre ele, o laser é detectado por um fotodiodo que envia essas informações de desvio do cantiléver 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), o esquema de funcionamento do AFM é mostrado na figura 27.

Figura 27: esquema de funcionamento do AFM. Fonte: Herrmann et al., 97.



O cantiléver e a agulha são os componentes sensores dos microscópios de varredura por força. A agulha é inserida no final do cantiléver e tem a função de mapear a amostra. O cantiléver por sua vez, mensura a força de interação entre a amostra e a agulha. O sistema de varredura é outro fator determinante da resolução do AFM. Este é formado por um sistema de varredura piezoelétrico que gera a movimentação necessária (x, y e z) para obtenção de imagens topográficas nas três dimensões e medidas de força. Dentre todas as forças que contribuem para as deflexões, a mais associada com a microscopia de força atômica, é a força interatômica denominada de van der Waals. O sistema de reflexão do feixe de laser mede o deslocamento do cantiléver através da incidência e reflexão de um feixe de laser na ponta livre espelhada do cantiléver. As operações de controle e realimentação, assim como a aquisição de dados, construção e processamento das imagens são realizadas por um microcomputador (Pinto et al., 2013; Meyer, 1992).

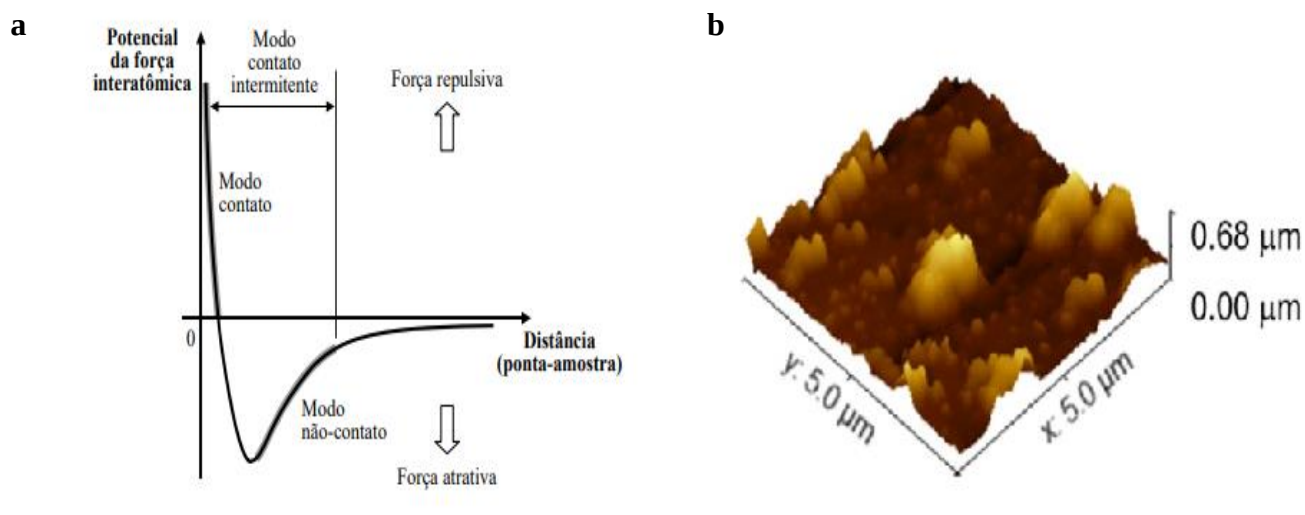
Na Figura 28a temos a relação qualitativa do potencial da força interatômica com a distância entre a ponta e a amostra. Dependendo do regime de forças escolhido, a geração de imagens em AFM pode ocorrer de três modos distintos: o modo contato, o modo tapping ou contato intermitente e o modo não contato. No modo contato a força entre ponta e amostra é repulsiva, no modo não contato o regime é de forças atrativas e no modo contato intermitente ocorre uma inversão no tempo entre forças atrativas e repulsivas. Na figura 28b temos uma imagem obtida via AFM. (Pinto et al., 2013; Sarid, 1991).

A AFM proporciona uma alta resolução espacial lateral e vertical na visualização de superfícies em nível atômico de diferentes materiais (metais, películas orgânicas, polímeros, amostras biológicas em sistemas condutores e isolantes) e em diversos meios (vácuo, pressão atmosférica, meios líquidos) (Mengui, 2006).

As interações de reconhecimento molecular são eventos importantes nos aspectos biológicos. Vários trabalhos, envolvendo a modificação química de superfícies e imobilização de moléculas, foram desenvolvidos para obtenção de imagens topográficas de alta resolução da interação Antígeno-Anticorpo com a técnica de AFM, através do monitoramento direto (sem a presença de marcadores). Perrin e colaboradores confirmaram a propriedade da AFM em detectar e quantificar reações imunológicas específicas através de imagens topográficas. Neste estudo, foram investigadas duas reações imunológicas em substrato de óxido de silício modificado com grupos silanos: anticorpos anti-ferritina de camundongo e anti-Ac de

camundongo conjugado com partículas de ouro coloidal, no modo não contato, e a reação entre moléculas de ferritina e anticorpos anti-ferritina, no modo contato. As reações foram quantificadas diretamente, detectando-se o anticorpo anti-ferritina e o antígeno e monitorando-se a rugosidade da superfície do substrato (Ferreira; Yamanaka, 2006).

Figura 28: **a)** Comportamento qualitativo da dependência do potencial da força interatômica com a distância entre a ponta de prova e a superfície da amostra. **b)** Imagem obtida via AFM. Fonte: Sarid, 1991 e próprio autor.



Em outro estudo, Hong et al. Propuseram uma técnica rápida e eficaz para detectar o enterovírus 71 (EV71), patógeno causador da doença pé-mão-boca (HFMD), com base no mecanismo da força intermolecular biológica, usando a microscopia de força atômica. Inicialmente, revestiram as partículas EV71 na superfície da mica e fabricaram os anticorpos EV71 (anti-EV71) fixados na ponta do AFM por meio de vários procedimentos químicos. Em seguida, a ponta quimicamente modificada do AFM foi aplicada para medir as forças de desenlace entre EV71 e anti-EV71 pelo modo de contato (Hong et al., 2017).

Processos de hibridização de DNA também podem ser avaliados pela técnica de AFM. Neste sentido, Chiorcea e Brett avaliaram desenvolveram dois procedimentos diferentes de imobilização de DNA de fita dupla (dsDNA) na superfície de um eletrodo de grafite pirolítico altamente ordenado (HOPG) foram avaliados pela Microscopia de força atômica no modo A/C magnético (MAC AFM) que é uma técnica delicada que permite a conexão direta e visualização de biomoléculas que estão suavemente ligadas à superfície do eletrodo (Chiorcea; Brett, 2004).

A microscopia de força atômica é uma nanotecnologia amplamente usada para geração de imagens e medição de força em biofísica e biologia. Sua alta sensibilidade na sondagem específica de ligação entre moléculas é aplicável à detecção de toxinas alimentares (Reese; Xu, 2019). Neste sentido, em 2009, Chen et al. utilizaram o método para detectar a toxina ricina ligada a uma superfície de ouro com uma ponta funcionalizada por anticorpos (Chen et al., 2009), atingindo a resolução de molécula única, correspondendo a um limite de detecção em subfemtomolar.

Em adição, alterações fisiopatológicas celulares são detectadas em escala molecular, o que é importante para revelar o aparecimento de doenças. Essas anormalidades podem perturbar a arquitetura e as funções celulares em escala molecular. No estudo realizado por Jin e colaboradores, as alterações induzidas pelo envelhecimento e pelo diabetes nas propriedades morfológicas e biomecânicas dos eritrócitos são claramente caracterizadas em escala nanométrica usando o microscópio de força atômica confirmando que o AFM pode potencialmente ser transformado em uma ferramenta poderosa no diagnóstico de doenças (Jin et al., 2010).

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo Geral

Desenvolver nanogenossensores eletroquímicos baseados em sistemas de nanopartículas de ouro para o diagnóstico da esquistossomose e da leishmaniose visceral em soro, urina e líquido cefalorraquidiano (LCR).

1.3.2 Objetivos Específicos

- Aperfeiçoar o sistema Mercaptopropiltrimetoxissilano e nanopartículas de ouro (MPTS_NPsAu) utilizando primers que serão utilizados na biodetecção;
- Determinar parâmetros físico-químicos dos oligonucleotídeos (primers) que serão utilizados como elementos de biodetecção;
- Avaliar o sistema desenvolvido com quantidades frente a diferentes concentrações de DNA de *S. mansoni* e *L. chagasi*;
- Estudar através de técnicas eletroanalíticas as propriedades interfaciais do sistema sensor, bem como avaliação da bioatividade deste sistema frente a amostras do de DNA de *S.mansoni* e *L. chagasi*;
- Analisar morfologicamente os sistemas desenvolvidos por microscopia de força atômica;
- Caracterizar através das técnicas de VC e EIE as interações entre as amostras de pacientes e o sistema diagnóstico desenvol
- vido e assim definir sua sensibilidade e especificidade.

2 METODOLOGIA

2.1 MATERIAIS

Amostras de *Schistosoma* e *Leishmania* foram fornecidas pelo Laboratório de Parasitologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (Recife, Brasil). Todas as amostras foram previamente caracterizadas utilizando a transcrição reversa seguida da reação em cadeia de polimerase em tempo real (RT-qPCR). 3- Mercaptopropiltrimetoxisilano (MPTS), ácido cloroáurico (HAuCl_4) e albumina de soro bovino (BSA) foram adquiridos da Sigma Chemical (St. Louis, MO, EUA). Ferro e ferricianeto de potássio foram obtidos da VETEC (Brasil). Todos outros produtos químicos utilizados neste trabalho foram de qualidade de grau de reagente e utilizados tal como recebidos sem purificação adicional. A água foi purificada com um sistema de purificação Millipore Milli-Q.

2.2 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR) 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 a técnica nested PCR (nPCR), no Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães na FIOCRUZ no estado de Pernambuco.

A extração e purificação de DNA das amostras de sangue foram realizadas utilizando o kit comercial ReliaPrep™ gDNA Tissue Miniprep System (Promega), seguindo as recomendações do fabricante. A extração do DNA nas amostras de urina foi feita pelo método de fenol-clorofórmio modificado (Silva et al., 2014).

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 espectrofotômetro e armazenado a -20°C . O primer tiolado utilizado foi Schfo17 (5'-GTGCTGGT GGGTTGACGAGTTC-3'). Este primer é específico para *S. mansoni* (Abath, 2002).

Leishmania (Leishmania) infantum (MHOM / BR / 1974 /PP75) promastigotas foram cultivadas em meio de Schneider e usadas como fonte de DNA. O DNA foi extraído das culturas usando o kit de isolamento de DNA de tecido Genomic Prep (GE, Amersham Place, Little Chalfont, Bucks, Reino Unido) de acordo às instruções do fabricante (Silva et al., 2014).

2.3 MODIFICAÇÃO DO ELETRODO COM MPTS E ELETRODEPOSIÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO

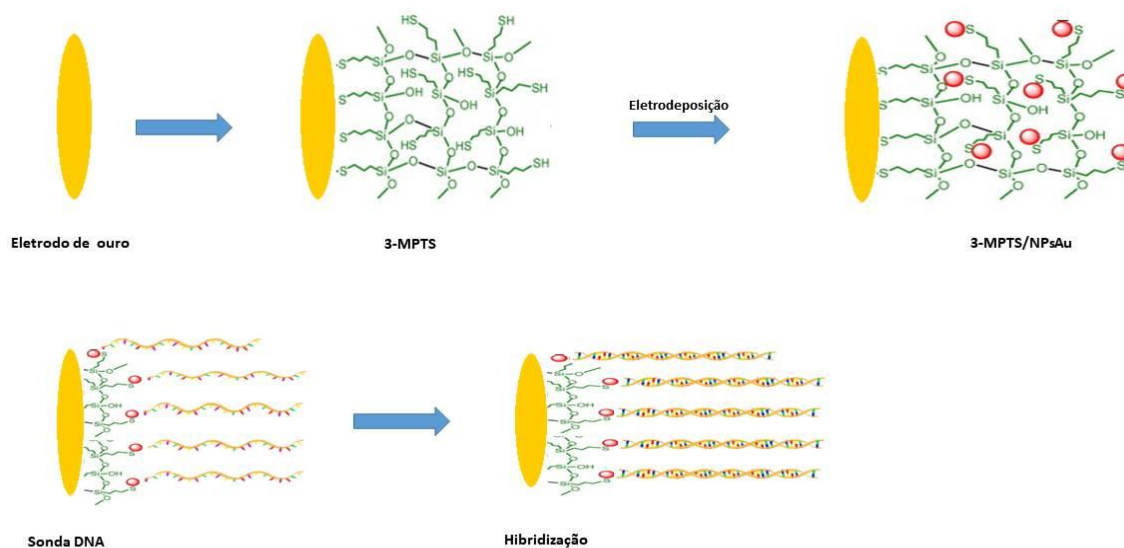
Primeiramente, uma solução de MPTS a 50 mM foi preparada diluindo o MPTS em água deionizada em uma proporção de 0.5: 100, em seguida 600 μL de HCL a 0.1 M foi adicionado, a mistura foi então sonicada por 9 min seguida de agitação por 45 minutos até a solução ficar transparente e homogênea, que foi então estocada sob refrigeração até o momento do uso (Das et al., 2014).

Antes da modificação a superfície do eletrodo de trabalho foi limpa com o auxílio de uma lixa seguido de imersão em hipoclorito de sódio por 10 minutos para eliminar qualquer resíduo aderido na superfície do eletrodo. Após o processo de limpeza, 4 μL da solução de 3-MPTS foi dispersa na superfície do eletrodo de trabalho, este silano tem afinidade pela superfície do ouro devido à presença do grupo tiol em sua estrutura, o mpts serve como uma

rede de ancoragem importante para a deposição da camada de nanopartículas. Em seguida, o eletrodo de trabalho junto com o contra eletrodo e o eletrodo de referencia foram imersos na solução de 1mM de HAuCl_4 em 0,5M H_2SO_4 para o processo de eletrodeposição. As nanopartículas de ouro (NPsAu) foram diretamente depositadas no eletrodo de trabalho previamente modificado com MPTS. O potencial aplicado foi de -0,2 a 1,3 V vs Ag / AgCl ciclados 30 vezes a uma velocidade de varredura de 50 mVs^{-1} , desta forma as nanopartículas recobriram toda a superfície do eletrodo.

2.4 MODIFICAÇÃO DO ELETRODO

Figura 29: Etapas de montagem da plataforma sensora. Fonte: Próprio autor.



Após a formação o sistema MPTS-NPsAu, a sonda de DNA foi imobilizada na superfície das NPsAu. BSA foi usado em todos os experimentos para bloquear as interações

não específicas. As etapas de montagem da plataforma sensora estão representadas na figura 29.

2.5 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 DNA alvo em diferentes concentrações.

2.6 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 $K_4[Fe(CN)_6]^{4-}/K_3[Fe(CN)_6]^{3-}$ (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. As análises de VC foram realizadas em uma faixa de potenciais entre 0,7 V e -0.2V a uma velocidade de varredura de 50mVs⁻¹. Todas as medições eletroquímicas foram realizadas em triplicado utilizando três amostras diferentes (n = 3).

2.7 MEDIÇÕES DE MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA

Análises estruturais do sistema foram realizadas utilizando um microscópio de força atômica (SPM-9700, Shimadzu Corporation, Japão) em modo não contato 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 5×5 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.



Label-free nanostructured biosensor for *Schistosoma mansoni* detection in complex biological fluids

Giselle S. Santos^{a,b}, Raquel G.S.C. Caldas^b, Fabio L. Melo^c, Igor S. Bruscky^d, Maria A.L. Silva^c, Leandro B. Wanderley^a, Cesar A.S. Andrade^b, Marla D.L. Oliveira^{a,b,*}

^a Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil

^b Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil

^c Departamento de Parasitologia, Instituto Aggeu Magalhães / FIOCRUZ, 50670-420, Recife, PE, Brazil

^d Faculdade de Medicina, UNINASSAU, 51021-140, Recife, PE, Brazil

^e Centro Universitário Brasileiro – UNIBRA, 50050-230, Recife, PE, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Schistosoma mansoni
Genosensor
Nanoparticles
Electrodeposition
Electrochemical impedance spectroscopy
Cyclic voltammetry

ABSTRACT

Schistosomiasis is a neglected tropical disease with a worldwide prevalence. Neuroschistosomiasis is the most severe presentation of the disease and affects the central nervous system. In this work, *Schistosoma mansoni* detection was based on self-assembled layers of 3-mercaptopropyltrimethoxysilane (MPTS) and electro-synthesized gold nanoparticles (AuNPs). The DNA probe was chemisorbed onto AuNPs. The biosensor was characterized by electrochemical impedance spectroscopy (EIS) and cyclic voltammetry (CV). The impedimetric response of the MPTS-AuNPs-DNA_{probe} system indicates an effective modification of the electrode surface. Topographical atomic force microscopy images were used to characterize the self-assembled layers on the gold electrode surface. The proposed biosystem was able to recognize the *S. mansoni* genome sequence at different concentrations in samples of urine, cerebrospinal fluid, and serum. Several concentration ranges were evaluated: urine (27–50 pg μL^{-1}), cerebrospinal fluid (25–60 pg μL^{-1}), and serum (27–42 pg μL^{-1}). The limit detection (LOD) of the biosensor was 0.6 pg μL^{-1} . The developed label-free genosensor was able to detect small concentrations of *S. mansoni* DNA in complex biological fluids.

1. Introduction

Schistosomiasis has a critical role for public health with socio-economic impacts on impoverished communities [1]. Of note, chronic *S. mansoni* infection leads to significant residual morbidity. The disease remains a devastating neglected tropical disease that affects approximately 260 million people worldwide [2,3]. Also, about 800 million people are currently at risk of developing schistosomiasis worldwide [4,5].

The symptomatology of the acute phase is related to fever, diarrhea, headache, asthenia, and anorexia, or even asymptomatic [6]. The continuous infections can result in granulomatous reactions and fibrosis in the affected organs. Also, these manifestations can occur associated with lesions of the central nervous system, polyposis with bloody diarrhea, splenomegaly, portal hypertension, and pulmonary hypertension [7]. Neuroschistosomiasis (NS) can clinically manifest as meningomyelodradiculitis, myelitis, and radiculitis. In addition, cerebral, pseudotumoral, or spinal forms are also observed. Medullary

schistosomiasis is the most severe clinical manifestation of the *S. mansoni* infection [8].

The intestinal schistosomiasis diagnosis is usually performed through the Kato-Katz fecal smear technique (a standard method recommended by the World Health Organization for qualitative and quantitative determination). However, the Kato-Katz technique is limited due to its low sensitivity, particularly in mild infections [9,10]. Immunological assays are used for performing the routine laboratory tests, especially in the chronic-phase chagasic infection [11]. The immunological assays are intradermal reaction, complement fixation reaction, indirect immunofluorescence, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and capture ELISA [12]. In addition, the immunological assays are dependent on the search for *S. mansoni* antibodies [13,14].

However, antibodies-based tests present limitations due to the cross-reaction with other antigens (mainly of other helminths), difficulty of differentiating from the active infection of the previous contact with the parasite, and low sensitivity for asymptomatic cases [15]. Cerebrospinal fluid (CSF) is extensively used for diagnosis of patients with

* Corresponding author. Departamento de Bioquímica, UFPE, 50670-901, Recife, PE, Brazil.

E-mail address: m.danielly@yahoo.com.br (M.D.L. Oliveira).

<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.05.111>

Received 12 March 2019; Received in revised form 29 May 2019; Accepted 29 May 2019
Available online 31 May 2019

0039-9140/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

clinically suspected NS [16].

In this context, electrochemical genosensors have become an alternative for the development of new diagnostic methods [17,18]. Nanomaterials have been used for the development of biodevices due to their huge surface-to-volume ratio, controlled size, and differentiated physicochemical properties. In addition, nanomaterials are extensively used to immobilize the recognition elements (e.g., DNA or proteins) [19].

AuNPs are the most commonly used nanomaterial in biosensor development through biomolecules conjugation [19]. AuNPs have been used associated with different nanomaterials as graphene oxide (GO) and carbon nanotubes (CNT) to obtain hybrids nanoplateforms for DNA detection [19,20]. Hybrids nanoplateforms improve the sensor performance due to the large surface area and good electrical conductivity attributed to a synergistic effect of these nanomaterials [21–24]. Electrochemical techniques can monitor variations in the electrical properties (resistance or capacitance) of the electrode surface [25]. Potentiodynamic methods (e.g., potential cycling) are suitable for obtaining AuNPs on the electrode surface [26,27]. Thus, impedimetric nanosensors are potentially promising due to their potential for rapid DNA detection with low cost and sensitivity [25,28].

In this connection, the present study evaluated the assembly process of the 3-mercaptopropyltrimethoxysilane (MPTS) and electrochemically synthesized AuNPs (Fig. 1) for *S. mansoni* genome detection. The organosilane (MPTS) was used to obtain compelling sol-gel derivative films to immobilize AuNPs since it interacts with the working electrode through Au-S bonds [29]. AuNPs were electrochemically synthesized, and the applied potential cycling controls the nucleation/growth process of the AuNPs [30]. Also, AuNPs offer a unique approach for immobilization of thiol-modified DNA. Therefore, the association of sol-gel derivative films with AuNPs allows the development of a genosensor for *S. mansoni* detection in CSF and other biological fluids.

2. Materials and methods

2.1. Materials

DNA samples of *S. mansoni* were assigned by the Department of Parasitology of the Aggeu Magalhães Institute (Recife, Brazil). RT-qPCR was useful for the previous characterization of all samples. 3-Mercaptopropyltrimethoxysilane (MPTS), Gold chloride (III) hydrate

(HAuCl₄·xH₂O), and bovine serum albumin (BSA) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Ferrocyanide and potassium ferrocyanide were obtained from VETEC (Brazil). DNA solutions were prepared in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4). The other chemicals used in this work were reagent grade and used as received without further purification. Ultrapure water was obtained from a Millipore Milli-Q system.

2.2. Sample preparation

Controls and patient's samples were collected ($v = 1$ mL) and their analyses consisted of general and specific cell counts, glucose, CSF, protein electrophoresis, and immunological determinations (ELISA) for schistosomiasis, herpes, syphilis, cysticercosis, toxoplasmosis, cytomegalovirus, Epstein-Barr virus, human immunodeficiency virus, varicella zoster, Cryptococcus, and human cell lymphotropic virus. The samples were also analyzed by nPCR [8]. Electrophoresis using genomic DNA from *S. mansoni* at different concentrations is shown in Fig. S1.

The urine samples ($v = 5$ mL) were transferred to a 15-mL Falcon tube. DNA was extracted according to Silva using protocol 2 [31]. Schistosome DNA was purified using the illustrated tissue & cells genomic Prep Mini Spin Kit (GE Healthcare, UK) according to the manufacturer's instructions. DNA samples from patients were extracted and purified using the illustrated blood genomic Prep Mini Spin Kit (GE Healthcare, UK) according to the manufacturer's instructions. Thus, it was quantified in a spectrophotometer and stored at -20°C . The isolated specific primer for *S. mansoni* was Schf17 (5'-GTGCTGGTGGGTTGACGAGTTC-3') [32].

2.3. Modification of the electrode surface

Initially, 50 mM MPTS solution was prepared by mixing MPTS with deionized water (0.5:100, v/v) and 600 μL of 0.1 mol L^{-1} HCl [33]. Then, the mixture was sonicated for 9 min followed by stirring for 45 min until obtaining a transparent homogeneous solution. The electrode surface was gently polished with sandpaper and deionized water. Subsequently, the bare gold electrode (BGE) was immersed in a solution of sodium hypochlorite for 10 min, washed with deionized water, and dried at room temperature. After, the electrode surface was modified with 4 μL of the homogeneous solution of MPTS by drop coating and allowed to dry at 25°C . Subsequently, 1 mM de HAuCl₄·xH₂O in

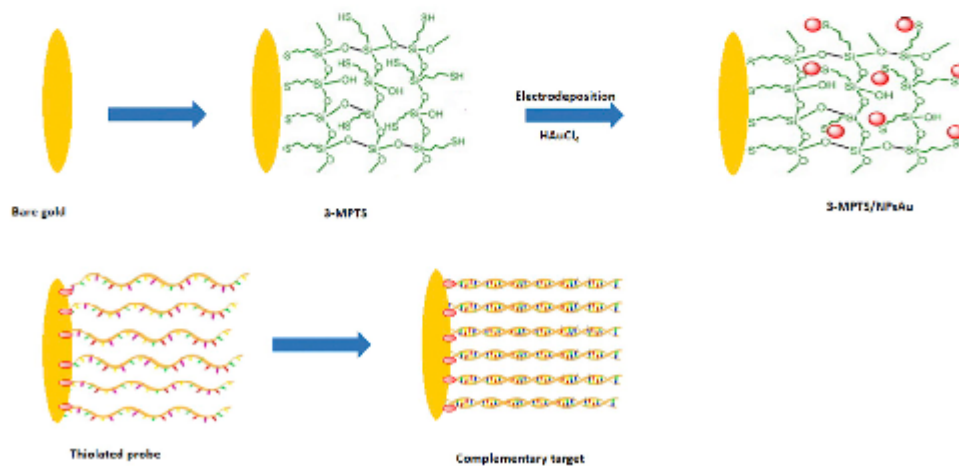


Fig. 1. Schematic representation of the fabrication process of the biosensor.

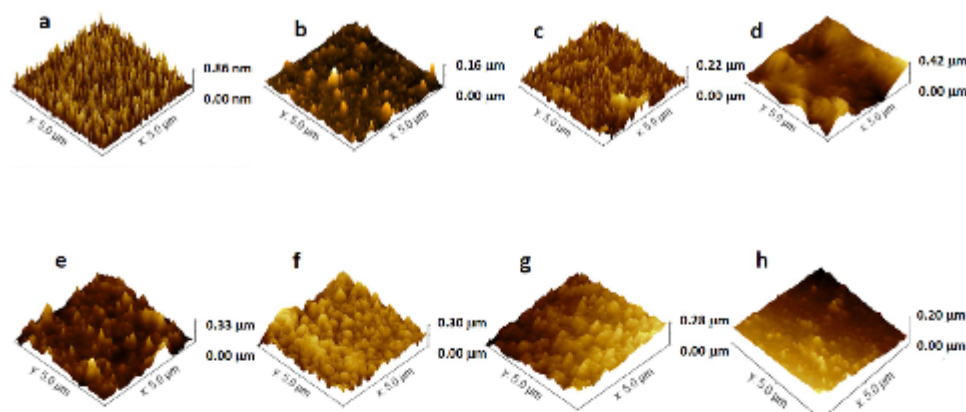


Fig. 2. AFM images for the stepwise modification process: a) MPTS/AuNPs; b) MPTS/AuNPs-DNA_{probe}; c) MPTS/AuNPs-DNA_{probe}-DNA_{worm}; d) MPTS/AuNPs-DNA_{probe}-DNA_{serum} sample; e) MPTS/AuNPs-DNA_{probe}-DNA_{urine} sample; f) MPTS/AuNPs-DNA_{probe}-DNA_{LCR} sample; g) MPTS/AuNPs-DNA_{probe}-DNA_{negative control}.

0.5 mol L⁻¹ H₂SO₄ was cycled 30 times in the range of potentials between +1.3 V and -0.2 V at a scan rate of 50 mV s⁻¹. AuNPs were directly deposited on the working electrode previously modified with MPTS. BSA was used in all experiments to avoid non-specific interactions.

2.4. Hybridization analysis

Target DNA was diluted in 10 mM PBS solution (pH 7.4), heated for 3 min at 40 °C (to denature the double-stranded DNA into single strands), and followed by hybridization with a complementary probe. Hybridization was performed by a simple drop-coating method using 2 μL of the target DNA obtained from CSF, urine, and serum at different concentrations. We also evaluated the electrochemical response of the biosensor after exposure to DNA samples containing ascorbic acid and cholesterol as interferents. In these assays, 2 μL of each sample was dropped on the sensor surface for 15 min. The selectivity study was carried out in 10 mM PBS solution (pH 7.4) containing 2 μL of the analyte and of each interferent. The stability was analyzed through the sensor responses after immersion in 5 mM NaOH solution and subsequent immobilization of the target DNA.

2.5. Electrochemical measurements

Cyclic voltammetry and electrochemical impedance measurements were performed using a PGSTAT 128N potentiostat/galvanostat (Autolab, The Netherlands) at room temperature. A three-electrode configuration was employed with an Ag/AgCl reference electrode (saturated KCl), a platinum wire electrode as the auxiliary electrode, and the gold electrode (BGE) as the working electrode. The impedance spectra were recorded within the 100 mHz and 100 kHz frequency range with an alternating voltage adjusted to an amplitude of 10 mV. The CV analysis was performed in the potential range between +0.7 V and -0.2 V at a scan rate of 50 mV s⁻¹. The electrolytic solution was 10 mM K₄[Fe(CN)₆]/K₃[Fe(CN)₆]³⁻ (1:1, v/v) in 20 mM PBS (pH 7.4). All electrochemical measurements were performed in triplicate (n = 3).

2.6. Atomic force microscopy measurements

AFM was used to perform structural analyses of the system in a non-contact mode in the air at room temperature (t = 25 °C) [34]. Cantilevers with an AFM silicon probe (Nanoworld, Japan, resonance

frequency = 300 kHz, spring constant = 42 Nm⁻¹) were used for all measurements. The images were collected with a scanning rate of 1.0 Hz in a scan area of 5 × 5 μm. The images were obtained from at least two macroscopically separated areas. The Gwyddion software was used to analyze the AFM images [35].

3. Results and discussion

3.1. Morphological characterization

Fig. 2a and b shows the BGE surface after modification with MPTS and electrodeposited AuNPs, respectively. Then, surfaces with a roughness of 0.86 nm (Fig. 2a) and 0.16 μm (Fig. 2b) were obtained, suggesting an efficient assembly of the layers. MPTS provides a 3D polymeric network with thiol tail groups that binds to gold surfaces. Also, this matrix provides a biocompatible environment that preserves the biological structure and activity after immobilization process. The polymeric network is essential to AuNPs assembly allowing the incorporation of a high amount of biomolecules that improve the sensor sensitivity. DNA probe immobilization resulted in changes of the surface roughness to 0.22 μm (Fig. 2c) in agreement with previous studies reported in the literature [33,36].

The specific interaction of the sensor and *S. mansoni* samples was evaluated. Significant changes in topography were observed for worm DNA (Fig. 2d), contaminated serum samples (Fig. 2e), urine (Fig. 2f), and LCR (Fig. 2g). The non-complementary target shows a homogeneous distribution on the electrode surface without the presence of aggregates (Fig. 2h). Thus, our results confirm the specificity of the sensor. AFM imaging is in good agreement with CV and EIS results.

3.2. Electrochemical characterization

The electrochemical characterization of the modified electrode was performed through cyclic voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy. From Fig. 3a, we can observe a decrease in the anodic peak current after the addition of MPTS (curve b) as compared to the unmodified electrode (curve a). Thus, we obtained an effective assembly of the MPTS layer on the electrode surface. The decreased current can be attributed to the increased steric hindrance of MPTS [37]. An increase of the anodic and cathodic peak currents was verified due to AuNPs electrodeposition, which results in a rise in the surface area and improvement of the conductivity (curve c). Further wane in

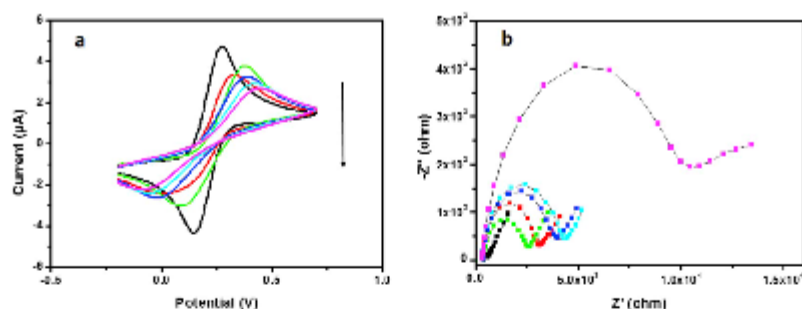


Fig. 3. (a) Cyclic voltammograms of the steps of electrode modification and bio-recognition processes: BGE (○), MPTS (●), MPTS, AuNPs (■), MPTS, AuNPs-DNA_{probe} (▲), MPTS, AuNPs-DNA_{probe}-BSA (◆), MPTS, AuNPs-DNA_{probe}-genome (◇), Cyclic voltammetry scan was initiated at -0.2 V vs. Ag/AgCl in positive direction at 50 mV s⁻¹. (b) Nyquist plots for the stepwise modification process: BGE (○), MPTS (●), MPTS, AuNPs (■), MPTS, AuNPs-DNA_{probe} (▲), MPTS, AuNPs-DNA_{probe}-BSA (◆), MPTS, AuNPs-DNA_{probe}-genome (◇).

the currents is observed after immobilization of the thiol-modified DNA probe on the MPTS-AuNPs system (curve d). BSA was used to block the remaining sites (curve e). In particular, after the hybridization process with the complementary genome, a further decrease in the anodic and cathodic peaks (curve f) was obtained due to additional blockage of the electron transfer to the electrode surface. Fig. 3b shows the impedance spectra of each stage of the sensor platform development in a frequency range between 100 mHz and 100 kHz. Significant differences in the impedance spectra were observed during the assembly of the sensor platform when compared to the unmodified gold electrode since each layer acts as a mass transfer block layer [34,38].

The electrochemical response of the genosensor was evaluated after exposure to different concentrations of target DNA (0.6, 1.3, 2.6, 5.2, 10.4, 20.9, 40.0, and 83.9 pg μL⁻¹). A nonconductive complex formation occurs after the recognition of the contaminated samples that difficult the passage of the faradaic current to the transducer [40]. The voltammetric response of the genosensor is proportional to the number of recognized molecules (Fig. 4a).

A modified Randles equivalent circuit was used [41] to fit the impedance data (Fig. 4b, solid lines). We obtained a good agreement between the equivalent circuit model and the experimental results. The circuit is composed of resistance of the solution (R_{sol}), charge transfer resistance (R_{ct}), constant phase element (CPE), and Warburg diffusion element (W). Ideally, W and R_{sol} represent the mass properties and diffusion characteristics of the redox probe in solution, respectively. CPE represents a non-ideal characteristic of double layer capacitance [42].

The performance of the genosensor was evaluated by the relative

variation of R_{ct} (ΔR_{ct}), providing quantitative information of the DNA hybridization processes. The ΔR_{ct} was calculated according to the following equation:

$$\Delta R_{ct}(\%) = ((R_{ct}(\text{sensor}) - R_{ct}(\text{unmodified})) / R_{ct}(\text{unmodified})) \times 100,$$

where R_{ct}(unmodified) is the value of the electron transfer resistance of the sensor system after the biorecognition process, and R_{ct}(sensor) is the value of the charge transfer resistance of the genosensor. The R_{ct} element depends on the insulating characteristic at the electrode/electrolyte interface. The filling of the recognition sites (θ) was calculated using the following equation $\theta = (1 - R_{ct}) / R_{ct}$, where R_{ct} is the R_{ct} of the biosensor and R_{ct} is the R_{ct} of the biosensor after exposure to different concentrations of the genomic target sequence. θ as a function of the concentration of the genomic target sequence is shown in Fig. 5. The value increases with increasing target DNA concentration and is found in 0.74 (74%) at a concentration of 83.9 pg μL⁻¹.

A linear behavior was obtained from 0.6 to 10.4 pg μL⁻¹ (inset of Fig. 5b). However, after this range of concentrations, a saturation profile is observed. The changes in R_{ct} are higher than those of other impedance components. Thus, R_{ct} was used to evaluate the interfacial properties of the sensor system.

3.3. Detection of *S. mansoni* in different biological fluids (cerebrospinal fluid, urine, and serum)

CSF is an important laboratory sample for diagnosis in patients with suspected neuroschistosomiasis [13]. Therefore, we performed electrochemical analysis of CSF samples from patients diagnosed with

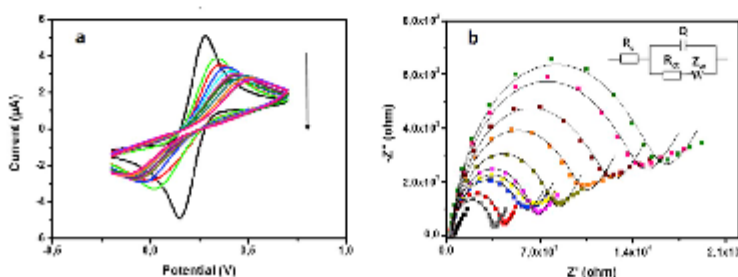


Fig. 4. (a) Cyclic voltammograms of the biosensor exposed to target genomic DNA: BGE (○), MPTS (●), MPTS, AuNPs (■), MPTS, AuNPs-DNA_{probe} (▲), MPTS, AuNPs-DNA_{probe}-BSA (◆), MPTS, AuNPs-DNA_{probe}-genome (◇), Biosensor-genome (0.6 pg μL⁻¹), Biosensor-genome (1.3 pg μL⁻¹), Biosensor-genome (2.6 pg μL⁻¹), Biosensor-genome (5.2 pg μL⁻¹), Biosensor-genome (10.4 pg μL⁻¹), Biosensor-genome (20.9 pg μL⁻¹), Biosensor-genome (40.0 pg μL⁻¹), and Biosensor-genome (83.9 pg μL⁻¹). (b) Nyquist plots of the biosensor after exposure to different concentrations of target genomic DNA and negative control: BGE (○), MPTS, AuNPs-DNA_{probe}-BSA (◆), Biosensor-genome (0.6 pg μL⁻¹), Biosensor-genome (1.3 pg μL⁻¹), Biosensor-genome (2.6 pg μL⁻¹), Biosensor-genome (5.2 pg μL⁻¹), Biosensor-genome (10.4 pg μL⁻¹), Biosensor-genome (20.9 pg μL⁻¹), Biosensor-genome (40.0 pg μL⁻¹), and Biosensor-genome (83.9 pg μL⁻¹). The solid lines represent the simulation data. Inset: Randles equivalent circuit.

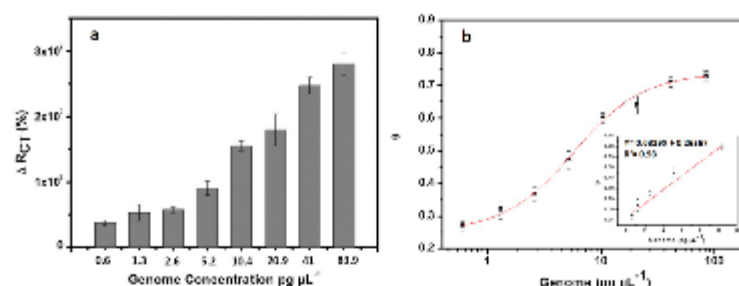


Fig. 5. (a) $\Delta R_{ct}\%$ and (b) θ as a function of different concentrations of the genomic target sequence.

Table 1

Equivalent circuit values obtained from fitted impedance results.

Modified electrode	Genomic target sequence ($\text{pg } \mu\text{L}^{-1}$)	$R_{ct}/k\Omega$	$Q/\mu\text{F}$	n
Bare gold electrode	–	0.16	6.66	0.51
MPTS-AuNP-DNA probe	–	3.84	2.08	0.86
Sensor system-DNA target	0.6	5.37	3.06	0.83
	1.3	5.85	3.06	0.83
	2.6	6.18	1.08	0.86
	5.2	7.64	1.23	0.86
	10.4	9.59	1.74	0.86
	20.9	11.40	1.63	0.87
	41.0	13.70	1.51	0.88
	81.0	15.10	1.44	0.89
Negative control	–	4.06	0.94	0.91
Sensor system-urine sample	50.0	9.0	0.90	0.91
	40.0	7.18	0.99	0.89
	36.0	6.42	1.06	0.90
	30.0	5.37	0.98	0.90
	27.0	4.94	1.10	0.91
Sensor system-CSF sample	60.0	11.3	2.78	0.85
	47.0	8.57	2.93	0.79
	34.0	6.11	1.92	0.85
	30.0	5.39	2.04	0.83
	25.0	4.50	3.03	0.82
Sensor system-serum sample	42.0	7.58	0.65	0.92
	39.0	6.92	0.55	0.93
	35.0	6.27	0.60	0.93
	31.0	5.63	0.93	0.90
	27.0	4.91	1.10	0.90

neuroschistosomiasis. Table 1 shows the $R_{ct}\%$ values of the samples containing DNA from the adult worm of *S. mansoni*. PCR was used to validate the concentrations of the genomic DNA from *S. mansoni*. There was no significant difference in DNA concentration detection by both measurement methods. The obtained values were used to get a reference standard curve with a limit of detection (LOD) of $0.6 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$.

Table 2

Comparison of the analytical performances of the proposed genosensor with other biosensors for the detection of *Schistosoma* sp.

Type of Biosensor	Analyte	Detect technique	Linear range	Limit	Reference
Piezoelectric Immunosensor	<i>S. japonicum</i>	quartz crystal	$10\text{--}200 \text{ ng mL}^{-1}$	5 ng mL^{-1}	[45]
Screen-Printed Biosensor	<i>S. mansoni</i>	cyclic and differential pulse voltammetry	$0.038\text{--}20 \text{ ng mL}^{-1}$	0.038 ng mL^{-1}	[46]
Electrochemical Biosensor	<i>Schistosoma</i> egg antigen	anodic stripping voltammetry (ASV)	$0.02\text{--}1 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$	$0.01 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$	[47]
Electrochemical Immunoassay	<i>S. japonicum</i>	stripping voltammetry	$2 \text{ ng mL}^{-1}\text{--}15 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$	1.3 ng mL^{-1}	[48]
Spectroelectrochemical Immunoassay	Soluble Egg Antigen (SEA)	UV/Vis spectrometry and cyclic voltammetry	–	$3.31 \times 10^{-9} \text{ ng mL}^{-1}$	[49]
Electrochemical Immunoassay	<i>S. japonicum</i>	linear sweep voltammetry (LSV)	$1\text{--}5000\text{--}1\text{--}100 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$	1:6457	[50]
Metalloimmunoassay	<i>S. japonicum</i> antibody	anodic stripping voltammetry (ASV)	$6.4 \text{ ng mL}^{-1}\text{--}100 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$	3.0 ng mL^{-1}	[51]
Genosensor	<i>S. mansoni</i>	Cyclic voltammetry and Impedance spectroscopy electrochemical	$27\text{--}50 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$ (urine) $25\text{--}60 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$ (CSF) $27\text{--}42 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$ (serum)	6.0 ng mL^{-1}	This work

Also, *S. mansoni* can be detected in other biological fluids, such as urine and serum. Urine is not a conventional sample for diagnosis of *S. mansoni* but is promising for DNA research. Urine has the great advantage of not being a sample of invasive collection and being easily obtainable. In this study, CSF, urine, and serum samples were analyzed under the same parameters. A significant increase in the R_{ct} values was obtained after the recognition of positive samples.

The sensitivity of the genosensor was evaluated through a calibration curve obtained from impedimetric responses obtained after its exposure to the target sample. The biosensor has demonstrated excellent sensitivity for detecting the genomic target at low concentrations in CSF, urine, and serum. Table 1 shows the fitted impedance parameters for different samples. The proposed biosensor is effective at low sample volumes ($2 \text{ } \mu\text{L}$). The comparison of the proposed genosensor with other previous biosensors is shown in Table 2. Thus, the present biosensor demonstrated the feasibility for rapid molecular detection of *S. mansoni* compared with other methods.

3.4. Selectivity and stability of the genosensor

The adsorption of interfering molecules on the electrode surface is a factor that can modify the electrochemical response [43] and suppress the electrode response [44]. The interferents tested in this work were ascorbic acid (AA) and cholesterol. Fig. S2 shows the impedimetric response of the genosensor in the presence of the complex mixtures (analyte + interfering substances). The results indicate that the response of the genosensor was not significantly affected in the presence of substances usually found in biological fluids such as AA and cholesterol.

The reusability of the biosensor was evaluated by immersing the genosensor in a solution of 5 mM NaOH for 5 min to unbind the genome. This process was repeated two more times on the same day (Figs. S3a and S3b). After 48 h of storage under refrigeration, the analytical tests were carried out under the same experimental conditions (Figs. S3c and

S3d). Thus, it was possible to confirm the stability of the genosensor. Therefore, the proposed sensor is a useful platform for rapid and specific detection of *S. mansoni* in different biological fluids as CSF, urine, and serum.

4. Conclusion

A novel electrochemical sensing platform based on a self-assembled layer of 3-mercaptopropyltrimethoxysilane and electrochemically synthesized AuNPs for diagnosis of schistosomiasis was successfully developed. The impedimetric and voltammetric analyses were effective to evaluate the process of modifying the electrode surface. The developed genosensor showed excellent performance in the detection of target genomic sequences at low concentrations in CSF, urine, and serum with a limit of detection (LOD) of $0.6 \text{ pg} \mu\text{L}^{-1}$. The developed system is presented as a promising alternative for the label-free detection of *Schistosoma* in CSF, urine, and serum.

Acknowledgments

G.S. Santos would like to thank CAPES for a Ph.D. scholarship. Oliveira and Andrade would like to thank National Council for Scientific and Technological Development - CNPq (grants 314894/2018-7 and 314756/2018-3).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.05.111>.

References

- [1] K.G. Weerakoon, G.N. Gobert, P. Cai, D.P. McManus, Advances in the diagnosis of human schistosomiasis, *Clin. Microbiol. Rev.* 28 (4) (2015) 959–967.
- [2] WHO, Schistosomiasis, Number of people treated worldwide in 2014, *Widy. Epidemiol. Rec.* 5 (91) (2016) 53–60.
- [3] R.G. Scholte, L. Gosoniu, J.B. Malone, F. Chammarin, J. Utzinger, P. Vounatsou, Predictive risk mapping of schistosomiasis in Brazil using Bayesian geostatistical models, *Acta Trop.* 132 (2014) 57–63.
- [4] M.F. Rose, E.E. Zimmerman, L. Hsu, A.J. Golby, E. Saleh, R.D. Folkerth, S.S. Santagata, D.A. Milner Jr., S.H. Ramakrishnan, Atypical presentation of cerebral schistosomiasis four years after exposure to *Schistosoma mansoni*, *Epilepsy Behav. Case Rep.* 2 (2014) 80–85.
- [5] WHO, Schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis: number of people treated in 2015, *Widy. Epidemiol. Rec.* 91 (2016) 585–600.
- [6] A.R. Prata, J.R. Coura, Fases e formas clínicas da Esquistossomose mansoni, in: O.S. Carvalho, P.M.J. Coelho, H.L. Lenz, (Eds.), *Schistosoma mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar* (online), Rocca/Rio de Janeiro, 2008, pp. 739–787.
- [7] M.J. Van Der Werf, S.J. De Vries, Mortality and infection with schistosomes and soil transmitted helminths, *Acta Trop.* 86 (2001) 1–3.
- [8] I.S. Bruscky, F.L. de Melo, Z.M. de Medeiros, F.F. Albuquerque, L.B. Wanderley, C. da Cunha-Correa, Nested polymerase chain reaction in cerebrospinal fluid for diagnosing spinal cord schistosomiasis: a promising method, *J. Neurol. Sci.* 366 (2016) 87–90.
- [9] J.M. Yu, S.J. de Vries, Q.W. Jiang, B. Gryseels, Comparison of the Kato-Katz technique, hatching test and indirect hemagglutination assay (IHA) for the diagnosis of *Schistosoma japonicum* infection in China, *Parasitol. Int.* 56 (2007) 45–49.
- [10] D.D. Lin, J.X. Liu, Y.M. Liu, F. He, Y.Y. Zhang, et al., Routine Kato-Katz technique underestimates the prevalence of *Schistosoma japonicum*: a case study in an endemic area of the People's Republic of China, *Parasitol. Int.* 57 (2008) 281–285.
- [11] R.R. Vilhote, F.P.C. Souza, A.P. Costa, F.C. Paria, L.S. Junior, A.P. Gomes, Schistosomiasis mansoni: diagnosis, treatment, epidemiology, prophylaxis and control, *Rev. Bras. Clínica Mov.* 10 (2012) 39–45.
- [12] M. Booth, P. Vounatsou, E.K. N'Goran, M. Tanner, S. Gadama, et al., The influence of sampling effort and the performance of the Kato-Katz technique in diagnosing *Schistosoma mansoni* and hookworm co-infections in rural Côte d'Ivoire, *Parasitol. Int.* 127 (2003) 525–531.
- [13] A.S. Andrade Filho, A.C. Queiroz, M.G. Reis, R.M. Amaral, R.M. Brito, Neuroesquistossomose, *Rev. Neurol.* 19 (2015) 165–209.
- [14] E.J. Oliveira, H.Y. Kanamura, L.C.S. Dias, L.C.B. Soares, D.M.C. Lima, R.M.C. Clarvalho, IgM-ELISA for diagnosis of schistosomiasis mansoni in low endemic areas, *Cad. Saúde Pública* 19 (2003).
- [15] Brasil. Saúde, Guia de vigilância epidemiológica e controle da melioidose/citropatia esquistossomática, Ronaldo Santos do Amaral, Brasília, 2006, p. 32.
- [16] G. Harter, H. Prickmann, S. Zerk, D. Wichmann, B. Ammann, P. Kern, B. Flötscher, E. Tarrich, 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.
- [17] P. Kara, C. Cavusoglu, S. Cavdar, M. Orsoz, Direct electrochemical genosensing for multiple point mutation detection of *Mycobacterium tuberculosis* during the development of rifampin resistance, *Biosens. Bioelectron.* 24 (6) (2009) 1796–1800.
- [18] A.C.H. Castro, E.G. Franc, L.P. de Paula, M.M.C.N. Soares, L.R. Coustert, J.M. Macário, A.G. Brito-Maduro, Preparation of genosensor for detection of specific DNA sequence of the hepatitis B virus in positive convert the hybridization into a measurable electric signal, *Appl. Surf. Sci.* 314 (2014) 273–279.
- [19] V.K. Gupta, M.L. Yola, M.S. Qureshi, A.O. Solak, N. Altar, Z. Ostindag, A novel impedimetric biosensor based on graphene oxide/gold nanoparticle for detection of DNA arrays, *Sensor. Actuator. B Chem.* 188 (2013) 1201–1211.
- [20] X. Yu, Y. Jiao, Q. Chai, Applications of gold nanoparticles in biosensors, *Nano LIFE* 06 (02) (2016) 1642001–1642011.
- [21] M.L. Yola, N. Altar, A novel voltammetric sensor based on gold nanoparticles involved in p-aminothiophenol functionalized multi-walled carbon nanotube application to the simultaneous determination of quercetin and rutin, *Electrochim. Acta* 119 (2014) 24–31.
- [22] M.L. Yola, T. Eren, N. Altar, A sensitive molecular imprinted electrochemical sensor based on gold nanoparticles decorated graphene oxide application to selective determination of tyrosine in milk, *Sensor. Actuator. B Chem.* 210 (2015) 149–157.
- [23] R. Oliveira, F.L. Pissatti, A.M.S. Luch, Fio Modified Electrodes by Direct Gold Electrodeposition: Production, Characterization and Electrochemical Sensor Application, *Quim. Nova*, 2016, pp. 146–155.
- [24] M.L. Yola, N. Altar, Z. Ostindag, A.O. Solak, A novel voltammetric sensor based on p-aminothiophenol functionalized graphene oxide/gold nanoparticles for determining quercetin in the presence of ascorbic acid, *J. Electroanal. Chem.* 698 (2013) 9–16.
- [25] A. Bonanni, M. del Valle, Use of nanomaterials for impedimetric DNA sensors: a review, *Anal. Chim. Acta* 678 (1) (2010) 7–17.
- [26] A. Ramanavicius, N. German, A. Ramanaviciene, Evaluation of electron transfer in electrochemical system based on immobilized gold nanoparticles and glucose oxidase, *J. Electrochem. Soc.* 164 (2017) C45–C49.
- [27] M. Elsam, N. Mohamed, Catalytic application of gold nanoparticles electrodeposited by fast scan cyclic voltammetry to glycerol electrooxidation in alkaline electrolyte, *Int. J. Electrochem. Sci.* 6 (2011) 4676–4689.
- [28] A. Giusippi-Ele, L. Ungerer, Impedimetric detection of DNA hybridization: towards near-patient DNA diagnostics, *Top. Curr. Chem.* 260 (2005) 161–186.
- [29] I. Pionowski, J. Grobelski, M. Chichowski, J. Rogowski, Investigation of 3-mercaptopropyltrimethoxysilane self-assembled monolayers on Au(111) surface, *Appl. Surf. Sci.* 242 (2010) 4332 (2005) 147–153.
- [30] M. Elsam, N. Mohamed, Catalytic application of gold nanoparticles electrodeposited by fast scan cyclic voltammetry to glycerol electrooxidation in alkaline electrolyte, *Int. J. Electrochem. Sci.* 6 (2011) 4676–4689.
- [31] M.A.L. Silva, Z. Medeiros, C.R.P. Soares, E.D. Silva, D.B. Miranda-Filho, F.L. Melo, A comparison of four DNA extraction protocols for the analysis of urine from patients with visceral leishmaniasis, *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 47 (2) (2014) 193–197.
- [32] F.G. Abath, F.L. Melo, R.P. Werhauer, L. Montenegro, R. Montenegro, H.C. Schneider, Single-tube nested PCR using immobilized internal primers, *Biotechniques* 33 (6) (2002).
- [33] R. Das, M.K. Sharma, V.K. Rao, B.B.K. J. Garg, V. Venkatesh, S. Upadhyay, An electrochemical genosensor for *Salmonella typhi* on gold nanoparticles-mercaptopropylamine modified screen printed electrode, *J. Biotechnol.* (2014) 9–16.
- [34] 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 *Craetula mollis* lectin affinity, *Sensor. Actuator. B Chem.* 155 (2) (2011) 789–795.
- [35] D. Noca, P. Klapetek, C. Anderson, Gwyddion (2008).
- [36] H.Y. Park, M.J. Schadt, I. Wang, S. Lim, P.N. Njoki, S.H. Kim, M.Y. Jung, 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.
- [37] H. Yi, W. Xu, Y. Yuan, Y. Wu, Y. Chai, R. Yuan, A sensitive electrochemical aptasensor for thrombin detection based on exonuclease-catalyzed target recycling and enzyme-catalysis, *Biosens. Bioelectron.* 47 (2013) 368–372.
- [38] G.S. Santos, C.A. Andrade, I.S. Bruscky, L.B. Wanderley, F.L. Melo, M.D. Oliveira, Impedimetric nanostructured genosensor for detection of schistosomiasis in cerebrospinal fluid and serum samples, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 137 (2017) 163–169.
- [39] D.M.N. Lima, K.Y.P.S. Avelino, M.T. Cordeiro, C.A.S. Andrade, M.D.L. Oliveira, Electrochemical immunosensor for dengue virus serotypes based on 4-mercaptopropylamine modified gold nanoparticles on self-assembled cysteine monolayers, *Sensor. Actuator. B Chem.* 220 (2015) 565–572.
- [40] J.B.B. Randles, Kinetics of rapid electrode reactions, *Discuss. Faraday Soc.* 1 (1947) 11–19.
- [41] E.J. Choi, D. Kim, K.S. Yun, A Study on the Electrical Circuit Model for Impedance-Based Microfluidic Sensor, *International Conference on Nanotechnology and Biosensors*, Singapore, 2011, pp. 85–89.
- [42] F.R.F. Leite, W.d.J.R. Santos, L.T. Kubota, Selective determination of caffeic acid in wines with electrochemical sensor based on molecularly imprinted siloxanes, *Sensor. Actuator. B Chem.* 193 (2014) 238–246.
- [43] D. Diamond, Principles of Chemical and Biological Sensors, John Wiley & sons, Inc., 1998.
- [44] Z. Wu, J. Wu, S. Wang, G. Shen, R. Yu, An amplified mass piezoelectric immunosensor for *Schistosoma japonicum*, *Biosens. Bioelectron.* 22 (2006) 207–212.
- [45] M. Shohayeb, H. Arida, G.A.M. Mensal, M. El-Badawy, Development of a nanotechnology - based printed biosensor for detection of *Schistosoma* nano antibodies, *Int. J. Electrochem. Sci.* 11 (2016) 1337–1344.

- [47] L. Xu, J. Du, Y. Deng, N. He, Fabrication of magnetic porous pseudo-carbon paste electrode electrochemical biosensor and its application in detection of schistosoma egg antigen, *Electrochem. Commun.* 12 (2010) 1329–1332.
- [48] J. Nie, Y. Zhang, W. Wang, Superhydrophobic surface-based magnetic electrochemical immunoassay for detection of *Schistosoma japonicum* antibodies, *Biosens. Bioelectron.* 33 (2010) 23–28.
- [49] J. Odondo, N. Noah, D. Andala, J. Kragu, M. Ndikau, G. Kimani, J. Mwaitha, Spectro-electrochemical characterization of anti-schistosoma- gold nanoparticles conjugate for use in immunoassays, *J. Korean Chem. Soc.* 9 (2016) 35–45.
- [50] X. Qiang, X. Chu, G. Shen, R. Yu, Electrochemical detection of *Schistosoma japonicum* antibody using biocatalytic deposition, *Anal. Lett.* 41 (2008) 2237–2250.
- [51] X. Chu, Z. Xiang, X. Fu, S. Wang, G. Shen, R. Yu, Silver-enhanced colloidal gold metal-immunoassay for *Schistosoma japonicum* antibody detection, *J. Immunol. Methods* 301 (2005) 77–88.

3.2 ARTIGO II — GOLD NANOPARTICLE-BASED NUCLEIC ACID BIOSENSOR FOR RAPID DETECTION OF LEISHMANIA INFANTUM

Research Article em preparação para submissão no periódico Analytica Chimica Acta Fator de impacto: 5.256; Qualis: A1



**GOLD NANOPARTICLE-BASED NUCLEIC ACID BIOSENSOR FOR RAPID
DETECTION OF LEISHMANIA INFANTUM**

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

*¹Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, Universidade Federal de
Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil*

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

*³ Departamento de Parasitologia, Instituto Aggeu Magalhaes /FIOCRUZ, 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

1. Introduction

Leishmaniasis are parasitic diseases caused by protozoa belonging to the genus *Leishmania*. The parasites are transmitted through the bites of sand flies and infect humans and other animal species such as dogs [1]. They are one of the most prevalent diseases in tropical and subtropical areas, affecting about 350 million people worldwide [2, 3]. They can manifest themselves in three main ways: mucocutaneous leishmaniasis, cutaneous leishmaniasis and visceral leishmaniasis [4]. Visceral manifestation is the most severe presentation of the disease. Symptoms are usually fever, weight loss, hepato and splenomegaly, hypergammaglobulinemia, and pancytopenia. When left untreated, visceral leishmaniasis (VL) is fatal in 90% of cases² [5, 6]. Visceral leishmaniasis is caused by the species *Leishmania donovani* and *Leishmania infantum* (*Leishmania chagasi*) and *L. infantum* is the species most commonly found in the American continents. It is a disease whose main vector is the mosquito of the genus *Lutzomyia*, being a fatal protozoonosis when not treated properly [7].

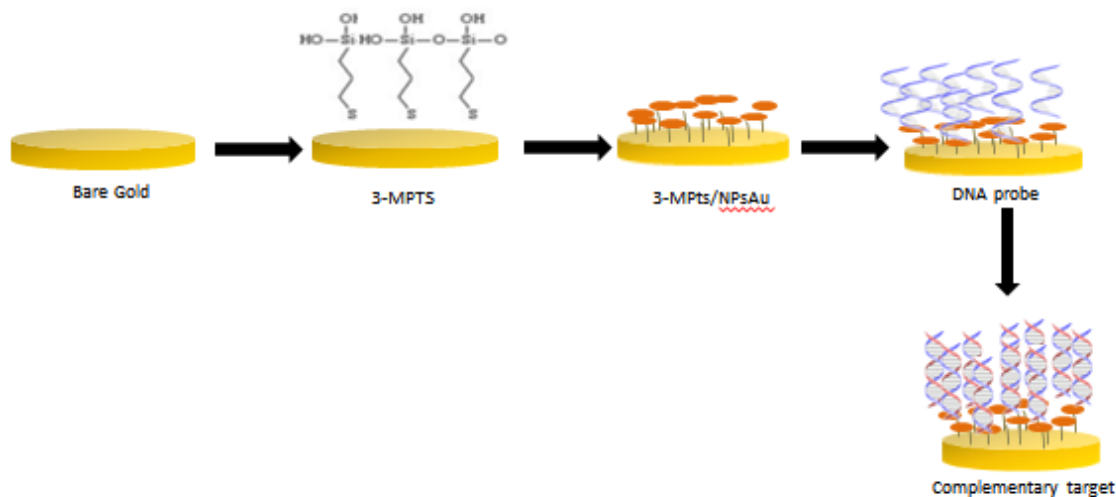
The methods currently employed in the clinical diagnosis of visceral leishmaniasis are costly, requiring numerous steps to be performed in addition to skilled labor, have reduced sensitivity to detect the early stages of the disease, generating false negatives [8]. The original technique of identifying amastigotes in spleen, bone marrow and lymph node aspirates remains the standard method for diagnosis [9]. However, this technique requires strict precautions, training and technical expertise, making it difficult to apply in routine and field studies [10-12]. Serological diagnoses are not ideal as they are unable to distinguish between disease stages and asymptomatic infections and are susceptible to cross reactions [13, 14]. Given this, new methodologies have been employed as alternatives for the diagnosis of this

pathology, including the use of interdigitated electrodes for antibody detection [15], application of paper biosensors [16] or nanoparticles for detection of antigens and non-amplified *Leishmania* DNA [17, 18]. Thus, it is clear the need to develop methodologies that allow a more sensitive and faster diagnosis, ensuring greater control of visceral leishmaniasis.

In this perspective, nanomaterials-based biosensors have attracted considerable attention due to their advantages such as low production cost, simplicity of handling, miniaturization and low power consumption [19-23]. Research in this field would be beneficial for the diagnosis, treatment and prevention of human diseases such as leishmaniasis. Electrochemical DNA biosensors are able to offer simple, fast, accurate and inexpensive methods for testing selected DNA sequences, and this has been a topic of considerable interest to many researchers [24-26].

In the present research, gold nanoparticles were electrodeposited in the presence of 3-mercaptopropyltrimethoxysilane (MPTS). MPTS interacts with the working electrode via Au-S bonds and was used to obtain effective sol-gel derived films to immobilize AuNPs [27]. The nanoparticles were then employed to immobilize a specific single stranded DNA probe (ssDNA) for *Leishmania infantum* and fabricating a marker-free electrochemical DNA biosensor (Fig. 1). The biosensor was able to detect *Leishmania infantum* DNA in serum from patients at different concentrations.

Figure 1. Schematic representation of the fabrication process of the biosensor.



2. Experimental section

2.1. Materials

3-Mercaptopropyltrimethoxysilane (MPTS), chloroauric acid and bovine serum albumin (BSA) were purchased from Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA). Potassium ferrocyanide and potassium ferricyanide were obtained from VETEC (Brazil). DNA samples from *Leishmania infantum* were provided by the Parasitology Laboratory of the Aggeu Magalhães Research Center (Recife, Brazil). All other chemicals used in this work were reagent grade quality, used as received without further purification. Water was purified with a Millipore Milli-Q purification system.

2.2. Sample preparation

Leishmania (Leishmania) infantum (MHOM / BR / 1974 /PP75) promastigotes were grown in Schneider's medium and used as a source of DNA. DNA was extracted from cultures using the Genomic Prep Tissue DNA Isolation Kit (GE, Amersham Place, Little Chalfont, Bucks, UK) according to the manufacturer's instructions. The amount of DNA was quantified by measuring absorbance at 260 nm [28].

2.3. Synthesis of gold nanoparticles

For cleaning the working electrode, the electrode surface was gently polished by hand with sandpaper and deionized water. Subsequently, the bare gold electrode (BGE) was immersed in a sodium hypochlorite solution for 10 min, washed with deionized water and dried at room temperature. After this pretreatment, a clean and stable gold surface was obtained. 4 μ L MPTS solution prepared according to literature [29] was then added to the electrode surface to serve as an anchor for nanoparticle deposition. The electrode was then transferred to a 1mM solution of $\text{HAuCl}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ in 0.5M H_2SO_4 . A potential variation between + 1.3 V and -0.2 V was applied at a sweep rate of 50 mV.s⁻¹ for 30 consecutive voltammetric cycles, thus the gold nanoparticles were electrodeposited on the electrode disc surface of gold. Thus, AuNPs coated the entire surface of the working electrode. The MPTS / Au electrode was then rinsed with distilled water and dried at room temperature.

2.4 Hybridization analysis

After modification of the electrode surface, the DnaLeishmania probe was immobilized on the gold electrode and acted as a biorecognition element. The DNA probe was diluted in 10 mM PBS solution (pH 7.4) and heated for 3 minutes at 40°C before the experiments. The hybridization process was performed by dripping 2 μ L of samples with different

concentrations of leishmania DNA on the gold electrode. The mounting steps of the sensor platform are shown in figure 1.

2.5. Electrochemical measurements

Voltammetric and impedimetric analyzes were performed using a PGSTAT 128N potentiostat / galvanostat (Autolab, The Netherlands) associated with a three electrode electrochemical cell. The gold electrode was used as working electrode, platinum wire as auxiliary electrode and silver / silver chloride as reference electrode. EIS measurements were performed at a frequency range between 100 MHz and 100 kHz, with a potential of 10 mV applied. CV analyzes were performed at a potential range between 0.7 V and -0.2V at a sweep speed of 50mVs⁻¹. Measurements were performed with electrodes immersed in potassium iron ferricyanide solution that functioned as a redox pair. All electrochemical measurements were performed in triplicate (n = 3).

2.6 Atomic force microscopy measurements

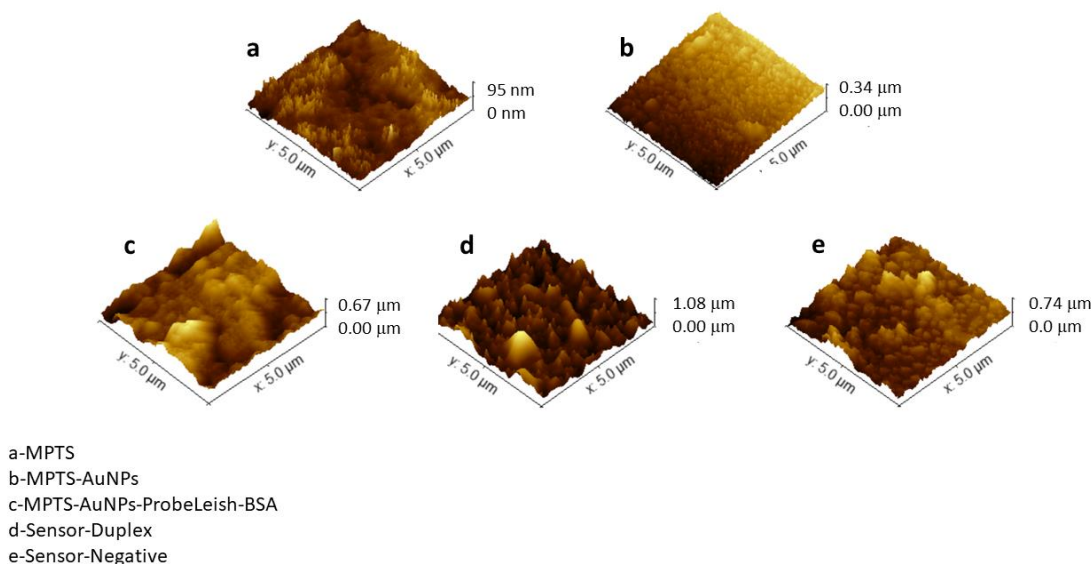
Topographic analysis of the system were performed through an atomic force microscope (SPM-9700, Shimadzu Corporation, Japan) in a noncontact mode in air at room temperature (approximately 25°C) [30]. Cantilevers with a silicon AFM probe (Nanoworld, Japan, resonant frequency = 300 kHz, spring constant = 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 5.0 × 5.0 μm. In addition, images were obtained and analyzed using AFM Gwyddion software [31].

3. Results and discussion

3.1. Morphological characterization

Figure 2 shows the BGE surface after modification with MPTS with peaks distributed around the surface roughness of about 95nm. After the addition of NPsAu, the presence of dispersed nanoparticles with a heterogeneous distribution with roughness of about 0.34 μm can be observed, suggesting an efficient assembly of the layers (Fig 2b). Immobilization of the DNA probe resulted in changes in surface roughness to 0.67 μm (Fig. 2c). The interaction between the *L. chagasi* sample and the sensor surface was evaluated and significant changes in topography were observed (Fig. 2d). The non-complementary target shows a homogeneous distribution on the electrode surface without significant changes (Fig. 2e) thus confirming the specificity of the sensor. Data from AFM morphological analysis were consistent with responses by VC and EIS analysis.

Figure 2: AFM images of the stepwise modification process: **a)** MPTS; **b)** MPTS_ AuNPs **c)** MPTS_ AuNPs- DNA_{probe}-BSA **d)** Sensor-Duplex **e)** Sensor-DNA_{negative control}.



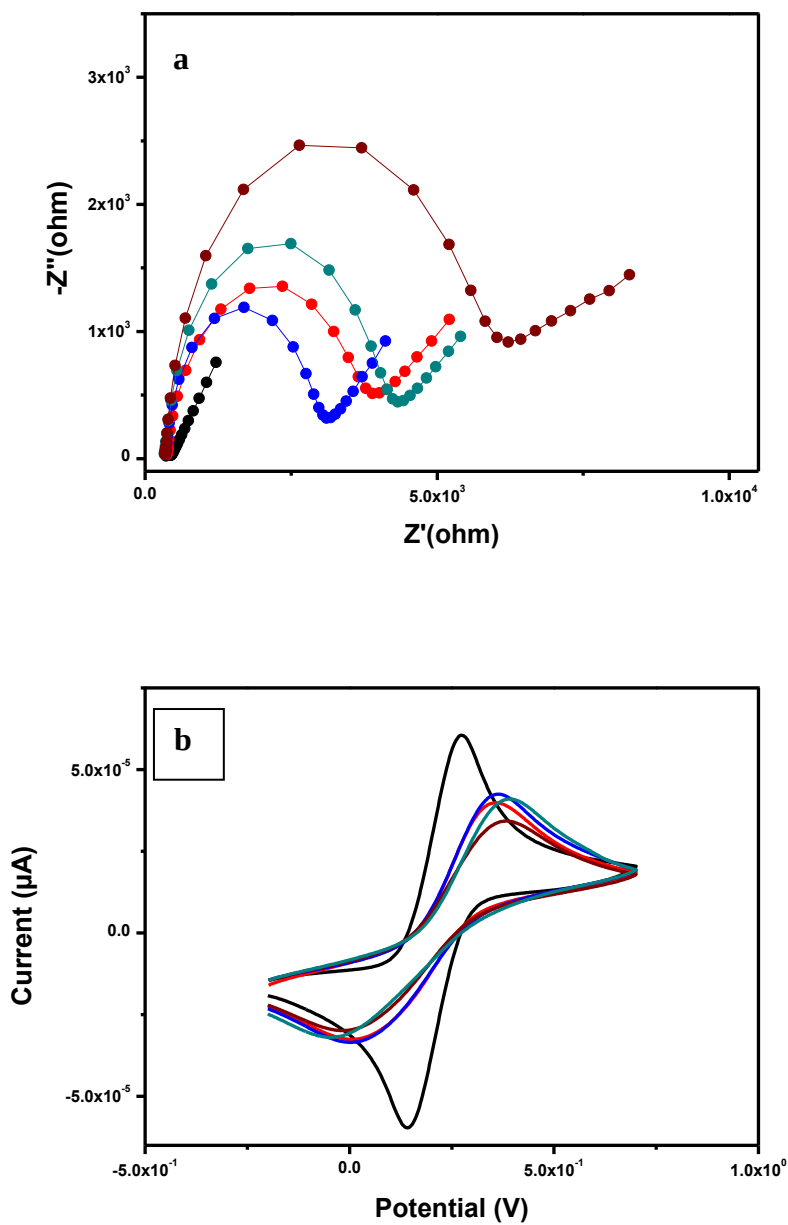
3.2 Electrochemical characterization of the sensor system 3-MPTS/NpsAu/DNA_{Leishmania}

Figure 3 shows the electrochemical characterization of the gold electrode modification steps performed by the cyclic voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy methods. In the Impedimetric response (Figure 3a) we can notice that the clean gold electrode, that is, without any modification presented a diminished amperometric response with semi-reversible behavior. With the addition of the 3-MPTS, the diameter of the nyquist diagram increased, proving the effective mounting of the 3-MPTS layer on the electrode surface. High impedimetric response can be attributed to increased MPTS steric impedance [32]. With the direct electrodeposition of gold nanoparticles a decrease in impedance was observed, which occurs due to the characteristics of the nanoparticles such as the increase of the electrode surface area and its electrical conductivity improvement. Finally it is possible to observe a further increase in this response due to immobilization of the DNA_{Leishmania}

In figure 3b shows the voltammetric response of the gold electrode modification process. The unchanged electrode cyclic voltammogram revealed a high electrode voltammetric response with well-defined anodic and cathode peaks that are behaviors of a semi-reversible system. During the mounting of the sensing platform significant changes in the voltammetry peaks were observed when compared with the unmodified gold electrode, as each layer on the electrode surface acts as a mass transfer blocking layer and hinder the diffusion of ferro-ferricyanide toward the electrode surface.

Figure 3. (a) Nyquist plots of the stepwise modification and immobilization process: BGE (●), MPTS (●), MPTS_AuNPs (●), MPTS_AuNPs-DNA_{probe} (●), MPTS_AuNPs-DNA_{probe}-genome (●). (b) Cyclic

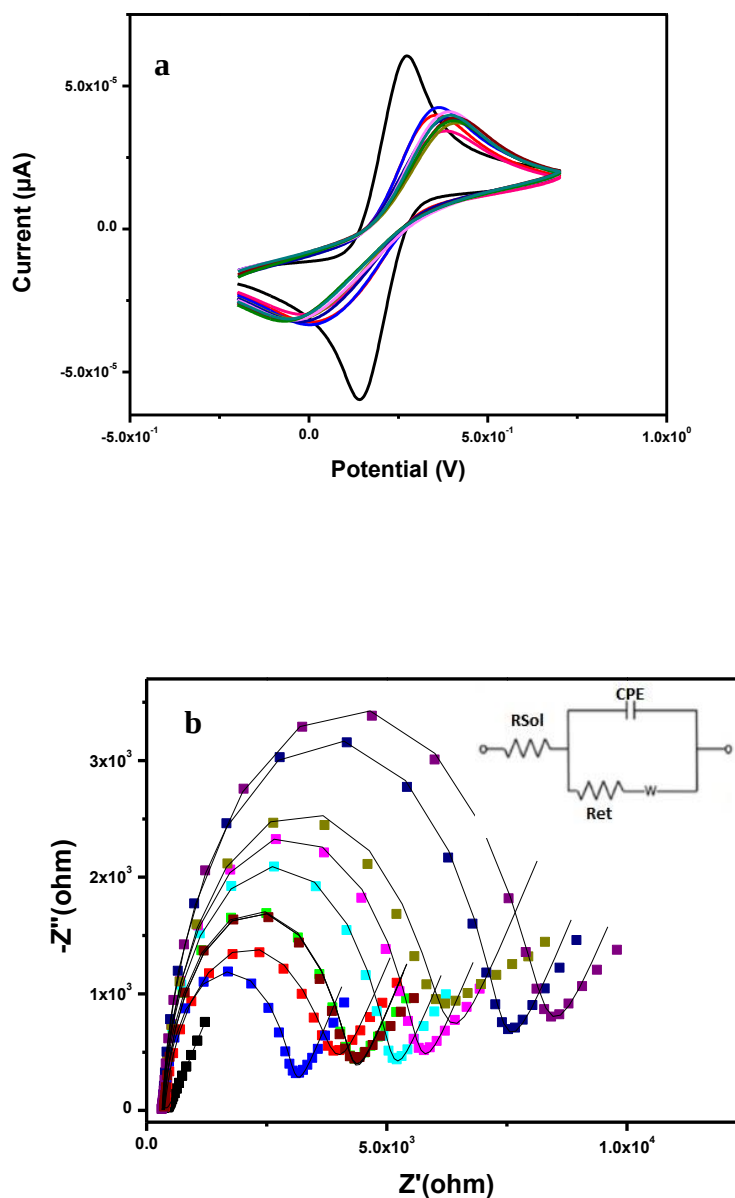
voltammograms of the modification and bio-recognition processes: BGE (—), MPTS (—), MPTS_AuNPs (—), MPTS_ AuNPs-DNA_{probe} (—), MPTS_ AuNPs-DNA_{probe}-genome (—). Cyclic voltammetry scan was initiated at - 0.2 V vs. Ag/AgCl in positive direction at 50 mV.s⁻¹.



Following standardization of the sensor system, the platform was evaluated after exposure to different DNA_{leishmania} concentrations. Concentrations ranged from 0.0001ng to

1ng and in all of them the sensor presented satisfactory responses as can be observed by the formation of a nonconductive complex after the recognition of contaminated samples thus hindering the passage of electric current [33]. The specificity of the genossensor was attested by submitting the sample containing *Schistosoma mansoni* DNA that functioned as negative control. Voltage and impedance data from the MPTS_NPsAu_Probe_{Leishmania} system evaluation are shown in Figures 4a and 4b respectively. Impedimetric response information was fitted to a modified Randles equivalent circuit [34] (insert figure 4b) that showed agreement of results. Circuit elements used include solution resistance (R_{sol}), load transfer resistance (R_{ct}), constant phase element (CPE), and Warburg impedance element (W). W and R_{sol} represent the properties of the electrolyte solution and the diffusion capabilities of the redox probe in solution, respectively. The CPE value is related to ionic charges, surface area, dielectric constant and layer thickness [35].

Figure 4. (a) Cyclic voltammograms of the biosensor exposed to target genomic DNA: BGE (—), MPTS (—), MPTS_AuNPs (—), MPTS_ AuNPs-DNA_{probe} (—), MPTS_ AuNPs-DNA_{probe}-genome (0.0001 ng.μL⁻¹) (—), Biosensor-genome (0,001 ng.μL⁻¹) (—), Biosensor-genome (0,01 ng.mL⁻¹) (—), Biosensor-genome (0,1 ng.μL⁻¹) (—), and Biosensor-genome (1.0 ng.μL⁻¹) (—) **(b)** Nyquist plots of the biosensor response when exposed to different concentrations of target genomic DNA and a negative control: BGE (■),MPTS (■), MPTS_AuNPs (■), MPTS_AuNPs-DNA_{probe} (■), Biosensor-genome (0.0001 ng.μL⁻¹) (■), Biosensor-genome (0.001 ng.μL⁻¹) (■), Biosensor-genome (0.01 ng.μL⁻¹) (■), Biosensor-genome (0.1 ng.μL⁻¹) (■), Biosensor-genome (1.0 ng.μL⁻¹) (■), and Biosensor-negative control (■).



3.3 Analysis of the 3-MPTS / NpsAu / Leishmania probe system against contaminated samples

Patient samples were evaluated by load transfer resistance (ΔR_{CT}) analysis, which provides us with relevant information about DNA hybridization processes. ΔR_{CT} can be calculated by the equation below:

$$\Delta R_{CT} (\%) = [(R_{CT(\text{recog})} - R_{CT(\text{sensor})}) / R_{CT(\text{sensor})}] \times 100,$$

The ΔR_{CT} value varies proportionally with the sample concentration. Table 1 shows the $R_{CT}\%$ values of samples containing Leishmania DNA where from these values a standard reference curve with a detection limit of 1pg / μl^{-1} was constructed.

The patient samples were analyzed under the same parameters as the purified samples and the values shown in Table 2 were obtained. These tested samples which can have their $R_{CT}\%$ values compared to the $R_{CT}\%$ values of the standard curve and thereafter find out up the positivity.

Table 1: Equivalavent circuit values obtained from fitted impedance results.

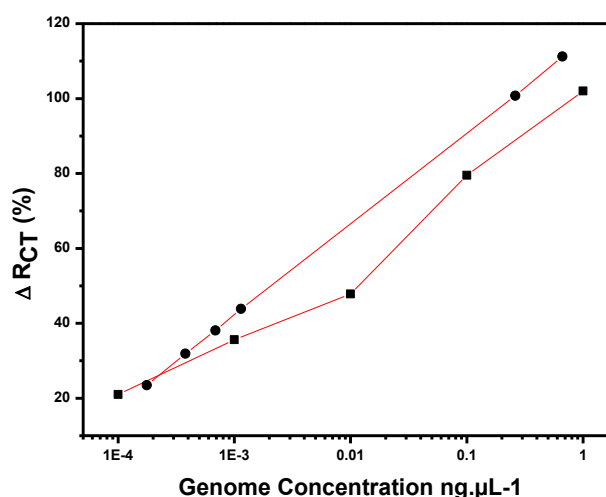
Modified electrode	[Genomic target sequence]	$R_{CT}/k\Omega$	$Q/\mu F$	N
Bare gold electrode	-	1.73	7.08	0.149
MPTS-AuNPs_DNA probe	-	3.85	7.63	0.918
Biosensor	0.0001	4.66	6.99	0.925
Biosensor	0.001	5.22	6.90	0.925
Biosensor	0.01	5.69	7.32	0.925
Biosensor	0.1	6.91	5.95	0.939
Biosensor	1.0	7.78	9.15	0.923
Negative contol		3.92	7.58	0.918

Tabela 2: $\Delta R_{CT}\%$ amostras de pacientes com leishmaniose

Modified electrode	[Genomic target sequence]	$R_{CT}/k\Omega$	$Q/\mu F$	n
Sensor system-Serum sample	1,01	7.82	6.75	0.939
	0.37	5.33	8.63	0.919
	0.31	5.08	8.44	0.923
	1.12	8.28	8.95	0.915
	0,15	4,44	6.87	0.934
	0.24	4.81	9.49	0.918

Results indicate that interactions between the probe and the genomic target sequence can be detected by the 3-MPTS-AuNPs-DNAprobe system. A significant increase in RCT% values was observed after recognition of both positive and purified samples (Fig. 5). Thus, we can prove that the sensing platform demonstrated a good sensitivity capable of detecting the genomic target in low concentrations of genetic material.

Figure 5. (a) $\Delta R_{ct}\%$ as a function of different concentrations of genomic target sequence: concentrações genoma leishmania (■), DNA do soro (●).



4. Conclusion

A simple electrodeposition method was used in the development of a new sensing platform for the diagnosis of visceral leishmaniasis. Impedimetric and voltammetric responses prove the efficient process of modifying the electrode surface. The developed genossensor showed excellent performance in the detection of target genomic sequences at low concentrations in serum with detection limit (LOD) of 0.1pg μL⁻¹. The developed system is presented as a promising alternative for *Leishmania infantum* marker free detection.

Acknowledgements

G.S. Santos would like to thank CAPES for a Phd scholarship. Oliveira and Andrade would like to thank CNPq (grant 302885/2015-3 and 302930/2015-9).

4. References:

- [1] D.K. Toubanaki, E. Athanasiou, E. Karagouni, Gold nanoparticle-based lateral flow biosensor for rapid visual detection of *Leishmania*-specific DNA amplification products, *Journal of Microbiological Methods* 127 (2016) 51-58.
- [2] E. Carrillo, L. Fernandez, A.V. Ibarra-Meneses, M.L.B. Santos, D. Nico, P.M. de Luca, C.B. Correa, R.P. de Almeida, J. Moreno, C.B. Palatnik-de-Sousa, F1 domain of the *leishmania* (*leishmania*) *donovani* nucleoside hydrolase promotes a th1 response in *Leishmania* (*leishmania*) *infantum* cured patients and in asymptomatic individuals living in an endemic area of leishmaniasis, *Front. Immunol* 8 (2017) 1-13.
- [3] D. Magana-Ortiz, F. Fernandez, A.M. Loske, M.A. Gómez-Lim, Extracellular expression in *aspergillus Niger* of an antibody fused to *Leishmania* sp. antigens, *Curr. Microbiol* 31 (2017) 1-9.
- [4] K. Jain, N.K. Jain, Vaccines for visceral leishmaniasis: a review, *J. Immunol. Methods* 422 (2015) 1-12.
- [5] E.M. Sales, G.S. Sousa, C. Belouezzane, F.C.L. Almeida, J.D. Figueroa-Villar, Expression, purification and spectrophotometric analysis of nucleoside hydrolase from *Leishmania chagasi* (LcNH), *Protein Expression and Purification* 161 (2019) 40-48.
- [6] A.N.S. Maia-elkhoury, J.M.D. Sena, Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges, *Cad Saude Publica* 24 (2008) 2941-2947.
- [7] J. Alvar, I.D. Vélez, C. Bern, M. Herrero, P. Desjeux, J. Cano, J. Jannin, M. Boer, Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence, *PLoS ONE* 7 (2012) e35671.
- [8] L.R. Goulart, C.U. Vieira, A.P.P. Freschi, F.E. Capparelli, P.T. Fujimura, J.F. Almeida, L.F. Ferreira, I.M.B. Goulart, A.G. Brito-Madurro, J.M. Madurro, Biomarkers for Serum Diagnosis of Infectious Diseases and Their Potential Application in Novel Sensor Platforms, *Crit. Rev.™ Immunol.* 30 (2010) 201-222.
- [9] S. Antinori, S. Calattini, E. Longhi, G. Bestetti, R. Piolini, C. Magni, G. Orlando, M. Gramiccia, V. Acquaviva, A. Foschi, S. Corvasce, C. Colomba, L. Titone, C. Parravicini, A. Cascio, M. Corbellino, Clinical use of polymerase chain reaction performed on peripheral blood and bone marrow samples for the diagnosis and monitoring of visceral leishmaniasis in HIV-infected and HIV-uninfected patients: a single-center, 8-year experience in Italy and review of the literature., *Clin Infect Dis* 44 (2007) 1602-1610.
- [10] S. Sundar, M. Rai, Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis, *Clin Diagn Lab Immunol* 9 (2002) 951-958.
- [11] A. Hailu, A.M. Musa, C. Royce, M. Wasunna, Visceral leishmaniasis: new health tools are needed., *PLoS Medicine* 2 (2005) e211.
- [12] E.S. Silva, C.M.F. Gontijo, M.N. Melo, Contribution of molecular techniques to the epidemiology of neotropical *Leishmania* species, *Trends Parasitol* 21 (2005) 550-552.
- [13] C.M.F. Gontijo, M.N. Melo, Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas., *Rev Bras Epidemiol* 7 (2004) 338-349.

- [14] F. Chappuis, S. Sundar, A. Hailu, H. Ghalib, S. Rijal, R.W. Peeling, J. Alvar, M. Boelaert, Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control?, *Nat Rev Microbiol* 5 (2007) 873-882.
- [15] Â.C. Perinoto, R.M. Maki, M.C. Colhone, F.R. Santos, V. Migliaccio, K.R. Daghashtanli, R.G. Stabeli, P. Ciancaglini, F.V. Paulovich, M.C. de Oliveira, O.N. Oliveira, Z. Jr, V., Biosensors for efficient diagnosis of leishmaniasis: innovations in bioanalytics for a neglected disease., *Anal. Chem.* 82 (2010) 9763-9768.
- [16] M.N. Costa, B. Veigas, J.M. Jacob, D.S. Santos, J. Gomes, P.V. Baptista, R. Martins, J. Inácio, E. Fortunato, A low cost, safe, disposable, rapid and selfsustainable paper-based platform for diagnostic testing: lab-on-paper, *Nanotechnology* 25 (2014) 094006.
- [17] M. Andreadou, E. Liandris, M. Gazouli, A. Mataragka, I. Tachtsidis, N. Goutas, D. Vlachodimitropoulos, J. Ikononopoulos, Detection of Leishmaniaspecific DNA and surface antigens using a combination of functionalized magnetic beads and cadmium selenite quantum dots, *J. Microbiol. Methods.* 123 (2016) 62-67.
- [18] M. Andreadou, E. Liandris, M. Gazouli, S. Taka, M. Antoniou, G. Theodoropoulos, I. Tachtsidis, N. Goutas, D. Vlachodimitropoulos, I. Kasampalidis, J. Ikononopoulos, A novel non-amplification assay for the detection of *Leishmania* spp. in clinical samples using gold nanoparticles., *J. Microbiol. Methods* 96 (2014) 56-61.
- [19] A. Rahi, K. Karimian, H. Heli, Nanostructuredmaterialsinelectroanalysisof pharmaceuticals, *Anal Biochem* 497 (2016) 39-47.
- [20] H. Heli, J. Pishahang, A.H. Barzegar, SynthesisofhexagonalCoAl-layered double hydroxidenanoshales/carbonnanotubescompositeforthenon-enzymatic detectionofhydrogenperoxide,, *J. Electroanal. Chem* 768 (2016) 134-144.
- [21] N. Sattarahmady, A. Movahedpour, H. Heli, G.R. Hatam, Goldnanoparticles-based biosensing of *Leishmania major* kDNA genome: visual and spectrophotometric detections, *Sens. Actuators B* 235 (2016) 723-731.
- [22] N. Sattarahmady, G.H. Tondro, M. Gholchin, H. Heli, Gold nanoparticles biosensor of *Brucella* spp. genomic DNA: visual and spectrophotometric detections, *Biochem. Eng. J.* 97 (2015) 1-7.
- [23] N. Sattarahmady, Z. Kayani, H. Heli, Highly simple and visual colorimetric detection of *Brucella melitensis* genomic DNA in clinical samples based on gold nanoparticles, *J. Iran.Chem. Soc* 12 (2015) 1569-1576.
- [24] H. Heli, N. Sattarahmady, G.R. Hatam, F. Reisi, R. Dehdari Vais, An electrochemical genosensor for *Leishmania major* detection based on dual effect of immobilization and electrocatalysis of cobalt-zinc ferrite quantum dots, *Talanta* 156-157 (2016) 172-179.
- [25] A. Rahi, N. Sattarahmady, H. Heli, Label-free electrochemical aptasensing of the human prostate-specific antigen using gold nanospears, *Talanta* 156- (2016) 218-224.
- [26] A. Rahi, N. Sattarahmady, H. Heli, An ultra sensitive electrochemical genosensor for *Brucella* based on palladium nanoparticles, *Anal Biochem* 510 (2016) 11-17.
- [27] I. Piwoński, J. Grobelny, M. Cichomski, J. Rogowski, Investigation of 3-mercaptopropyltrimethoxysilane self-assembled monolayers on Au(111) surface, *App Surf Sci* 242 (2005) 147-153.
- [28] M.A. Silva, Z. Medeiros, C.R. Soares, E.D. Silva, D.B. Miranda-Filho, F.L. Melo, A comparison of four DNA extraction protocols for the analysis of urine from patients with visceral leishmaniasis, *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 47(2) (2014) 193-7.
- [29] R. Das, M.K. Sharma, V.K. Rao, B. B.K, I. Garg, V. Venkatesh, S. Upadhyay, An electrochemical genosensor for *Salmonella typhi* on gold nanoparticles-mercaptosilane modified screen printed electrode., *J Biotechnol* (2014) 9-16.

- [30] M.D. Oliveira, C.A. Andrade, M.T. Correia, L.C. Coelho, P.R. Shing, X. Zeng, Impedimetric biosensor based on self-assembled hybrid cysteine-gold nanoparticles and CramoLL lectin for bacterial lipopolysaccharide recognition, *J Colloid Interface Sci* 362 (2011) 194-201.
- [31] D. Necas, P. Klapetek, C. Anderson, Gwyddion, (2008).
- [32] H. Yi, W. Xu, Y. Yuan, Y. Wu, Y. Chai, R. Yuan, A sensitive electrochemical aptasensor for thrombin detection based on exonuclease-catalyzed target recycling and enzyme-catalysis, *Biosens Bioelectrom* 47 (2013) 368-372.
- [33] D.M.N. Luna, K.Y.P.S. Avelino, M.T. Cordeiro, C.A.S. Andrade, M.D.L. Oliveira, Electrochemical immunosensor for dengue virus serotypes based on 4-mercaptobenzoic acid modified gold nanoparticles on self-assembled cysteine monolayers, *Sensors and Actuators B: Chemical* 220 (2015) 565-572.
- [34] J.B.B. Randles, Kinetics of rapid electrode reactions Discuss, *Faraday Soc* 1 (1947) 11-19.
- [35] 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.

3.3 PATENTE I — PLATAFORMA DE OURO ELETRODEPOSITADO PARA DETECÇÃO DO GENOMA DO VERME DE *SCHISTOSOMA MANSONI*

Patente depositada na POSITIVA-UFPE – Diretoria de inovação sob o nº:

BR 10 2018 008064 4



Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de
Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2018 008064 4

PLATAFORMA DE OURO ELETRODEPOSITADO PARA DETECÇÃO DO GENOMA DO VERME DE SCHISTOSOMA MANSONI

Campo da Invenção

01. A presente invenção é aplicável à área de dispositivos nanoestruturados utilizados para diagnóstico através do uso de biossensores eletroquímicos, e refere-se a métodos e composições para identificação de patógenos. A invenção refere-se à aplicação de uma sequência curta de oligonucleotídeos (sonda de DNA) modificada com o grupamento tiol em sua extremidade, ligadas quimicamente a superfície de nanopartículas de ouro (NpsAu) previamente eletrodepositadas na superfície do eletrodo de ouro modificado com camada auto-montada de 3-mercaptopropiltrimetoxisilano (MPTS) para detecção de patógenos em amostras biológicas em baixas concentrações. Em particular, na presente invenção, foi desenvolvido um genossensor para a identificação de sequências específicas do DNA do *Schistosoma mansoni* em amostras de pacientes infectados.

02. A associação entre materiais nanométricos e biomoléculas são de interesse na biotecnologia e química bioanalítica, pois as nanopartículas podem melhorar o desempenho dos biossensores. As nanopartículas apresentam diversas aplicações como: carreadores para entrega controlada de fármacos, separação de proteínas e de células, detecção de patógenos e desenvolvimento de sensores eletroquímicos para o diagnóstico de diversas patologias. (Oliveira et al., 2011). As nanopartículas de ouro também têm demonstrado vasto potencial em diferentes aplicações biológicas, incluindo a sua utilização no desenvolvimento de métodos diagnósticos altamente sensíveis. As NpsAu apresentam a vantagem de formarem partículas

pequenas, com elevada razão área/volume, alta homogeneidade, de fácil preparação e superfície química reativa a qual permite que moléculas orgânicas se liguem a ela. Em adição, as nanopartículas são biocompatíveis sendo, portanto úteis na imobilização de biomoléculas por manterem a atividade biológica destes materiais. Desta forma, no desenvolvimento de biossensores utilizando DNA essas nanopartículas têm sido utilizadas diante de suas excelentes propriedades. (COSTA et al., 2014).

Sumário

03. O invento aqui descrito é oriundo da aplicação de técnica eletroquímica simples para a eletrodeposição de nanopartículas de ouro e sua aplicação no desenvolvimento de biossensores com elevada sensibilidade e especificidade para o diagnóstico da esquistossomose. Desta forma, expomos uma metodologia de preparação por meio da técnica de eletrodeposição de nanopartículas de ouro (NpsAu) sobre a superfície do eletrodo.

04. As nanopartículas da presente invenção têm áreas de superfície elevadas e propriedades físico-químicas únicas fazendo delas ideais para o desenvolvimento de sistemas de biossensoriamento. O uso das nanopartículas de ouro (NpsAu) na preparação de biossensores eletroquímicos se deve às suas características, como alta eletrocondutividade, energia de superfície e a razão entre superfície e volume, propriedades eletrocatalíticas, possibilidade de atuar como fios condutores elétricos entre a superfície do eletrodo e o analito permitindo a transferência eletrônica direta (Boujakhrou, 2016). Além de que o ouro proporciona estabilidade química adequada para a funcionalização de oligonucleotídeos, proteínas, biomoléculas entre

outros, além de possuir alta condutibilidade térmica, baixa resistividade elétrica e baixa interação com o oxigênio do ar para formar óxidos.

Anterioridades: Estado da Técnica

05. A esquistossomose mansoni é uma doença parasitária causada pelo helminto *Schistosoma mansoni*, sendo uma doença importante no contexto da saúde pública brasileira. Sendo encontrada em muitas regiões tropicais do globo. Sua principal manifestação ectópica é a neuroesquistossomose, que se caracteriza pelo comprometimento do sistema nervoso central (SNC) decorrente da infecção pelo *S. mansoni*. Quando sintomática, é um grave distúrbio no qual o prognóstico depende em grande parte do diagnóstico e tratamento precoces.

06. A confirmação do diagnóstico da esquistossomose é tomada principalmente pela análise de amostras fecais. Algumas metodologias de teste de diagnóstico, tais como ELISA, imunoensaio de fluorescência indireta e radioimunoensaio, são comumente usados para diagnosticar a esquistossomose. No entanto, estes métodos são geralmente complicados e demorados. Em relação à neuroesquistossomose geralmente o diagnóstico faz-se tardiamente, não raro em achados de autópsia ou quando o paciente está em fase terminal da doença. Ante o exposto faz-se necessário o desenvolvimento de um método de detecção rápido, sensível e seletivo para a determinação da infecção pelo *schistosoma* tanto para a proteção da saúde quanto para a continuação do tratamento médico.

07. Recentemente, o uso de eletrodos nanoestruturados na área da química analítica vem se tornando uma tendência, a fim de melhorar a sensibilidade, seletividade e rendimento de sensores analíticos eletroquímicos e biossensores.

Atribui-se o aumento do desempenho eletroanalítico de eletrodos nanoestruturados a sua alta condutividade, a grande área de superfície, a estabilidade e biocompatibilidade. Diferentes métodos de modificação de eletrodo são utilizados para aumentar a sua sensibilidade e especificidade atenuando assim os inconvenientes inerentes na detecção do analito.

08. As nanopartículas de ouro vêm ganhando destaque em inúmeras aplicações biológicas. Destacamos os numerosos métodos que têm sido desenvolvidos para a identificação de sequências de DNA tais como as técnicas ópticas, elétricas e gravimétricas. Todos estes procedimentos oferecem diferentes vantagens para a detecção de alvos específicos de sequência de DNA.

09. Muito empenho tem sido feito no intuito de elaborar metodologias mais eficientes no diagnóstico e prevenção desta patologia, neste sentido, foi elaborada a patente C.N. Pat. 105891465 A, que se refere à construção de um sensor de nanobastões de ouro como um novo método de detecção de antígeno circulante de *Schistosoma japonicum*. O sensor compreende anticorpos de *Schistosoma* presos a um suporte de fase sólida de ITO combinada com hastes de ouro para detecção do antígeno circulante de *Schistosoma* para o diagnóstico, onde através de sensores de varredura UV foi possível observar mudanças nos picos de extinção para determinar a infecção por *Schistosoma japonicum* ou não.

10. A patente WO 2012145398 A1, descreve um método diagnóstico para *S. haematobium*, baseado em um método de enriquecimento e um teste colorimétrico para detectar anticorpos anti-schistosoma. As patentes U.S. Pat US 6261788 B1; US 6818402 B2; US 5583011 também propõem métodos de detecção do *Schistosoma* sp., seja esta detecção baseada na detecção de antígenos, ou pela utilização de

técnicas de amplificação do DNA (PCR). Desta maneira a presente invenção se diferencia das anteriormente expostas pelo fato de ser à única que utiliza sistema de genossensor baseado em eletrodeposição de nanopartículas no seu desenvolvimento.

11. A invenção aqui apresentada mostra um processo de síntese de nanopartículas de ouro e sua utilização na montagem de um genossensor eletroquímico visando sua utilização principalmente, mas não restrita, na área biomédica.

12. Muito embora tais documentos apresentem semelhança em relação a presente patente, as diferenças existentes podem ser observadas através da comparação entre esses documentos que pode ser visualizada na Tabela I abaixo

13. Tabela I - comparação entre as componentes características de cada invento

	Invento apresentado	CN 105891465 A	US 6261788 B1	WO 2012145398 A1	US 6818402 B2
Nanomaterial	Sim	Sim	NÃO	Não	Não

Polímero	Não	Sim	Não	Não	Não
Sequência de DNA	Sim	Não	Não	Não	Sim
Anticorpos	Não	Sim	Sim	Sim	Não
Deposição eletroquímica	Sim	Não	Não	Não	Não
Técnica eletroquímica/Impedância eletroquímica	Sim	Não	Não	Não	Não

Problemas e Limitações do Estado da Técnica

14. A principal dificuldade observada no desenvolvimento da técnica é superar a limitação da quantidade de sonda de DNA que pode ser imobilizada no genossensor, bem como a melhora da sensibilidade da sonda para a detecção desta hibridação. Desta forma, a fim de aumentar a quantidade de hibridação bem como a sensibilidade de sua detecção fizemos uso de nanomaterias, nanopartículas de ouro depositadas eletroquimicamente sobre o eletrodo de ouro previamente modificado com MPTS, sendo as nanopartículas são indicadas para este fim devido a sua elevada área superficial e excelentes propriedades eletroquímicas. Podemos assim desenvolver um dispositivo específico, de alta sensibilidade e economicamente viável.

Objetivos da Invenção

15. O objetivo da presente invenção é apresentar um genossensor impedimétrico nanoestruturado com camadas auto-montadas de silano na superfície de um eletrodo de ouro e nanopartículas de ouro eletroquimicamente depositadas. A presente invenção evita e dispensa a necessidade de marcadores, uma vez que esta técnica revela alterações nas propriedades elétricas da superfície, tal como a resistência e capacitância que têm uma resposta representativa a partir da presença da molécula alvo, sem marcadores.

16. A presente invenção também tem como objetivo o desenvolvimento de novos sistemas nanoestruturados obtidos por síntese eletroquímica em escala nanométrica para produção em larga escala e de baixo custo operacional.

Solução

17. O ato inventivo relacionado com a presente invenção é a obtenção de um sistema de camadas auto-montadas de silano na superfície de um eletrodo de ouro e nanopartículas de ouro eletroquimicamente depositadas que fornecerá um diagnóstico rápido e preciso. Isso faz com que este dispositivo forneça a vantagem em comparação aos métodos atuais de diagnóstico da esquistossomose de apresentar-se como uma técnica com economia de tempo e custo.

Vantagens

18 A obtenção de nanopartículas pelo método eletroquímico apresenta vantagens, tais como: aumentar a condutividade do eletrodo, facilitar a transferências de elétrons e melhora da sensibilidade analítica e seletividade, proporcionando o desenvolvimento de dispositivos eletroquímicos mais eficientes.

19. Por causa da sua simplicidade, a técnica da hibridação é a mais comumente usada nos diagnósticos laboratoriais do que o método de sequenciamento direto, na análise de sequência gênica específica. Na hibridação do DNA, a sequência gênica alvo é identificada por meio de uma sonda de DNA que forma um híbrido de dupla hélice com o seu ácido nucléico complementar, sendo esse reconhecimento altamente eficiente e específico. O Transdutor eletroquímico (eletrodo) de DNA apresenta a vantagem de apresentar uma grande diversidade de suportes utilizados e pela facilidade de modificação dos mesmos. Após modificação com a sonda de DNA, o eletrodo então produzido, é capaz de detectar eletroquimicamente a molécula complementar de DNA, apresentando-se como uma promissora ferramenta para aplicação na área biomédica.

20. O biodispositivo da invenção mostra respostas satisfatórias frente a diferentes concentrações de DNA alvo na amostra analisada, além de ser de fácil manuseio, o que é uma vantagem, pois permite sua aplicação em laboratórios de análises clínicas, além de laboratórios de ensino e pesquisa.

A novidade e o efeito técnico alcançado

21. Resumindo, a novidade da presente invenção é a metodologia diagnóstica utilizando nanopartículas de ouro eletroquimicamente depositadas para o desenvolvimento de genossensores, até o presente momento, esta metodologia não foi identificada por nenhuma outra instituição de pesquisa ou ensino ou mesmo descrita na literatura.

Descrição Detalhada

22. Os exemplos a seguir não têm o intuito de limitar o escopo da invenção, mas sim de somente ilustrar uma das inúmeras maneiras de se realizar a invenção.

23. Resumidamente consegue-se chegar à invenção primeiramente pela deposição direta das nanopartículas de ouro sobre o eletrodo de trabalho previamente modificado com o MPTS. Foi utilizada uma faixa de potencial de -0,2 a 1,3 V vs Ag / AgCl ciclado 30 vezes a uma velocidade de varredura de 50 mV. s⁻¹, numa solução a 1mM de HAuCl₄ contendo 0,5M de H₂SO₄.

24. O procedimento seguido para preparar o genossensor foi o seguinte: O eletrodo foi polido com uma lixa com água deionizada, seguido por imersão em solução de hipoclorito de sódio durante aproximadamente 5 minutos e secou-se à temperatura ambiente. Após lavagem com água deionizada o eletrodo foi imediatamente modificado pela adição de 3-Mercaptopropiltrimetoxisilano (MPTS). O grupamento tiol expostos pelo MPTS é importante para a posterior ancoragem das nanopartículas de ouro via eletrodeposição. Em seguida, foi feita a eletrodeposição das NpsAu levando ao aumento da superfície eletroativa do eletrodo. Posteriormente, a incubação da sonda foi realizada por um período de tempo de ao menos 10 minutos e, finalmente, a amostra com o DNA-alvo pelo mesmo período (Fig.1, p.1). A lavagem foi executada com água deionizada após cada incubação. O exemplo a seguir mostra um caso mais específico de realização.

25. Exemplo 1. Síntese e caracterização das nanopartículas

Preparação de Nanopartículas

26. As nanopartículas de ouro foram diretamente depositadas sobre o eletrodo de trabalho previamente modificado com o MPTS. Uma solução de 50.0 mM de MPTS foi preparada diluindo o MPTS em água deionizada em uma proporção 0.5:100, em seguida adicionou-se a esta solução 600µL de 0.1M de HCl levada ao sonificador por aproximadamente 9 minutos seguida de agitação por mais 45 minutos. Posteriormente, uma alíquota deste material foi adicionada à superfície do eletrodo. Para a deposição eletroquímica foi utilizada uma faixa de potencial de -0,2 a 1,3 V vs Ag / AgCl ciclado 30 vezes a uma velocidade de varredura de 50 mV. s⁻¹, numa solução a 1mM de HAuCl₄ contendo 0,5M de H₂SO₄.

Caracterização de Nanopartículas

27. As análises impedimétricas e amperométricas foram realizadas com potenciostato / galvanostato PGSTAT 128N (Autolab, Holanda), em uma célula eletroquímica de três eletrodos, imersos numa solução de 10 mM de ferro-ferricianeto de potássio K₄ [Fe(CN)₆]⁴⁻ / K₃ [Fe(CN)₆]³⁻ na proporção (1:1) - usada como uma sonda redox. A superfície do eletrodo de trabalho foi de ouro. Eletrodos de fio de platina e Ag / AgCl (solução saturada de KCl) foram usados como eletrodo auxiliar e de referência, respectivamente. Os experimentos impedimétricos foram realizados a uma frequência entre 100 mHz e 100 kHz, com um potencial de 10 mV aplicado. Análises amperométricas foram realizadas em um intervalo de potenciais entre 0,7 V e -0.2V a uma velocidade de varredura de 50mVs⁻¹.

Características das nanopartículas

28. O artifício utilizado na construção do biodispositivo foi a imobilização de uma sequência específica do DNA do *Schistosoma mansoni* na superfície do

eletrodo, que vai se ligar a sequência alvo através de processos de hibridação. Empregamos ainda diferentes concentrações deste DNA alvo que foram imobilizados para testar a sensibilidade do dispositivo aqui descrito. Figura 1 (p.1).

29. A Figura 2 (p.3) mostra a voltametria cíclica das etapas de montagem do genossensor onde podemos observar que antes da modificação as correntes de pico redox encontram-se bem definidas (preto). Depois da modificação do eletrodo com o MPTS houve uma diminuição desses picos comprovando a formação da camada orientada de MPTS na superfície do eletrodo, dificultando assim a transferência de elétrons entre a superfície do ouro e a solução redox (vermelho). O grupamento tiol exposto pelo MPTS é importante para a posterior ancoragem das nanopartículas de ouro via eletrodeposição. Seguida da eletrodeposição das NpsAu houve um acréscimo nas correntes de pico (verde). Este comportamento indica que as NpsAu foram eficientemente ancoradas pelos grupamentos tióis expostos pelo MPTS levando ao aumento da área de superfície eletroativa do eletrodo. Com a imobilização da sonda de DNA tiolada, ocorreu nova diminuição da corrente, em decorrência à repulsão eletrostática entre o par redox e a sonda de DNA na superfície do eletrodo (azul). Por fim após adição de amostra com DNA complementar, nova redução foi observada indicando a ocorrência do processo de hibridação (rosa) e consequente bioreconhecimento do sistema sensor desenvolvido.

30. A Figura 3 (p.4) demonstra a Espectroscopia de Impedância Eletroquímica, também do processo de modificação da superfície de eletrodo de trabalho, onde as modificações são comprovadas pelo aumento do diâmetro do semicírculo do diagrama de Nyquist, sendo este aumento proporcional a Resistência à transferência de Carga (RCT). O eletrodo sem modificações (preto) em sua superfície apresenta gráfico com um comportamento quase linear devido o processo ser limitado por

difusão, no gráfico em vermelho observa-se a ligação de MPTS à superfície do genossensor. É possível notar nítido aumento do diâmetro do semicírculo quando comparado com o eletrodo sem modificação, seguida por um decréscimo deste diâmetro quanto a eletrodeposição da nanopartículas devido às suas características condutoras. O semicírculo volta a aumentar e esta característica se mantém à medida que as camadas vão sendo acrescidas ao dispositivo, refletido pelo aumento gradual de sua resistência para o sistema MPTS\NpsAu-Sonda_{Shistosoma} como para o sistema após bioreconhecimento MPTS\NpsAu Sonda_{Shistosoma+Genoma} o que corrobora com as análises de voltametria cíclica.

Referências

31. Costa, M. P., C. A. Andrade, R. A. Montenegro, F. L. Melo, M. D. Oliveira. J Colloid Interface Sci.433 (2014),141-148.
32. Oliveira, M. D. L., M. L. Nogueira, M. T. S. Correia, I. C. B. B. Coelho, C. A. S. Andrade. Sensors and Actuators B: Chemical 155(2) (2011). 789-795.
33. Boujakhrou, A., Díez, P., Sánchez, A., et al., Journal of Colloid and interface Science. 07 (2016).74
34. Liu, S., Liu, J., Wang, L., Zhiao, F. Bioelectrochemistry. 79 (2010), 37.
35. Souza, K. C., Mohallen, N. D. S., Sousa, E. M. B. Quim. Nova 34 (2011), 1692.
36. Li, F., Han, X., Liu, S. Biosens. Bioelectron., 26 (2011), 2619.

REIVINDICAÇÕES

01. PLATAFORMA DE OURO ELETRODEPOSITADO PARA DETECÇÃO DO GENOMA DO VERME DE SCHISTOSOMA MANSONI é um genossensor caracterizado por ser formado pelos componentes a seguir: a) uma molécula de reconhecimento (sequência de ácido nucléico) modificada com o grupo tiol, b) um suporte onde em sua superfície será feita a imobilização das moléculas, c) uma fonte de corrente elétrica, d) Nanopartículas de ouro (NpsAu) e) 3-Mercaptopropiltrimetoxisilano (MPTS) sendo a detecção do analito realizada através da análise das interações interfaciais do eletrodo.

02. PLATAFORMA DE OURO ELETRODEPOSITADO PARA DETECÇÃO DO GENOMA DO VERME DE SCHISTOSOMA MANSONI conforme reivindicação 1 caracterizada pela presença de nanopartículas que são obtidas a partir de um processo de eletrodeposição das nanopartículas de ouro sobre a superfície modificada com MPTS.

03. PLATAFORMA DE OURO ELETRODEPOSITADO PARA DETECÇÃO DO GENOMA DO VERME DE SCHISTOSOMA MANSONI, refere-se a métodos e composições para identificação de patógenos, caracterizada por baseia-se na aplicação de uma sonda de DNA modificada com o grupo tiol em nanopartículas de ouro diretamente eletrodepositadas na superfície do eletrodo modificado com MPTS para detecção de patógenos em amostras com baixas concentrações, em particular foi desenvolvido um genossensor para a identificação do DNA do *Schistosoma mansoni* em amostras de pacientes infectados.

04. DETECÇÃO ELETROQUIMICA DO GENOMA DO VERME DE SCHISTOSOMA MANSONI e superfície de imobilização das moléculas, conforme reivindicação 1, caracterizada pelo fato da referida superfície ser de ouro, o que proporciona uma maior condutibilidade elétrica e biocompatibilidade ao dispositivo facilitando assim a interações moleculares.

05. PLATAFORMA DE OURO ELETRODEPOSITADO PARA DETECÇÃO DO GENOMA DO VERME DE SCHISTOSOMA MANSONI caracterizada por um método para obtenção de nanopartículas de ouro, as nanopartículas de ouro foram diretamente depositadas sobre o eletrodo de trabalho previamente modificado com o MPTS, para a deposição eletroquímica foi utilizada uma faixa de potencial de -0,2 a 1,3 V vs Ag / AgCl ciclado 30 vezes a uma velocidade de varredura de 50 mV. s⁻¹, numa solução a 1mM de HAuCl₄ contendo 0,5M de H₂SO₄.

06. DETECÇÃO ELETROQUIMICA DO GENOMA DO VERME DE SCHISTOSOMA MANSONI UTILIZANDO NANOPARTICULAS DE OURO, caracterizado pela modificação camada a camada da superfície do biodispositivo seguida da análise impedimétrica e voltamétrica, ao término de cada período de incubação da etapa de modificação a lavagem foi executada com água deionizada.

07. DETECÇÃO ELETROQUIMICA DO GENOMA DO VERME DE SCHISTOSOMA MANSONI UTILIZANDO NANOPARTICULAS DE OURO de acordo com a reivindicação 6, caracterizada por utilizar os métodos de detecção espectroscópica por meio de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica e Voltametria Cíclica.

08. DETECÇÃO ELETROQUIMICA DO GENOMA DO VERME DE SCHISTOSOMA MANSONI utilizando nanopartículas de ouro, conforme reivindicação 6, caracterizado pela exposição do grupamento tiol pelo MPTS.

09. DETECÇÃO ELETROQUIMICA DO GENOMA DO VERME DE SCHISTOSOMA MANSONI utilizando nanopartículas de ouro, conforme reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que o grupamento tiol expostos pelo MPTS é importante para a posterior ancoragem das nanopartículas de ouro via eletrodeposição

11. DETECÇÃO ELETROQUIMICA DO GENOMA DO VERME DE SCHISTOSOMA MANSONI utilizando nanopartículas de ouro conforme reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que as referidas nanopartículas acumulam as propriedades magnéticas e elétricas do ouro, sendo portanto importantes ferramentas na construção de biossensores.

12. DETECÇÃO ELETROQUIMICA DO GENOMA DO VERME DE SCHISTOSOMA MANSONI utilizando nanopartículas de ouro conforme reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que a sonda imobilizada na superfície da nanopartícula é caracterizada por ser uma sequência específica do material genético do *schistosoma mansoni*, proporcionando ao referido biossensor uma alta especificidade da resposta.

13. DETECÇÃO ELETROQUIMICA DO GENOMA DO VERME DE SCHISTOSOMA MANSONI utilizando nanopartículas de ouro, conforme reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que a referida análise é feita em uma faixa de frequência de 100 MHz e 100 kHz e numa faixa de potencial de -0.2V e 0.7 V, respectivamente.

14. DETECÇÃO ELETROQUIMICA DO GENOMA DO VERME DE SCHISTOSOMA MANSONI utilizando nanopartículas de ouro caracterizado pelo uso da nanopartícula de ouro em biossensores abrangendo ao menos um agente imobilizador e no mínimo um agente ativador das ligações moleculares, para a elaboração de ferramentas para uso diagnóstico.

15. DETECÇÃO ELETROQUIMICA DO GENOMA DO VERME DE SCHISTOSOMA MANSONI utilizando nanopartículas de ouro caracterizado pelo uso da nanopartícula de ouro em biossensores, abrangendo ao menos um agente imobilizador e no mínimo um agente ativador das ligações para o desenvolvimento de biodispositivos eletroquímicos.

16. DETECÇÃO ELETROQUIMICA DO GENOMA DO VERME DE SCHISTOSOMA MANSONI utilizando nanopartículas de ouro caracterizado pelo uso da nanopartícula

de ouro em biossensores, conforme reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que o referido dispositivo é um genossensor eletroquímico.

17. DETECÇÃO ELETROQUIMICA DO GENOMA DO VERME DE SCHISTOSOMA MANSONI utilizando nanopartículas de ouro caracterizado pelo uso da nanopartícula de ouro em biossensores na área médica, biológica e farmacológica.

18. DETECÇÃO ELETROQUIMICA DO GENOMA DO VERME DE SCHISTOSOMA MANSONI utilizando nanopartículas de ouro caracterizado pelo uso da nanopartícula de ouro em biossensores e no mínimo monômero funcionalizado com oligonucleotídeo para elaboração de biossensores e biodispositivos.

6. FIGURAS

Figura 1

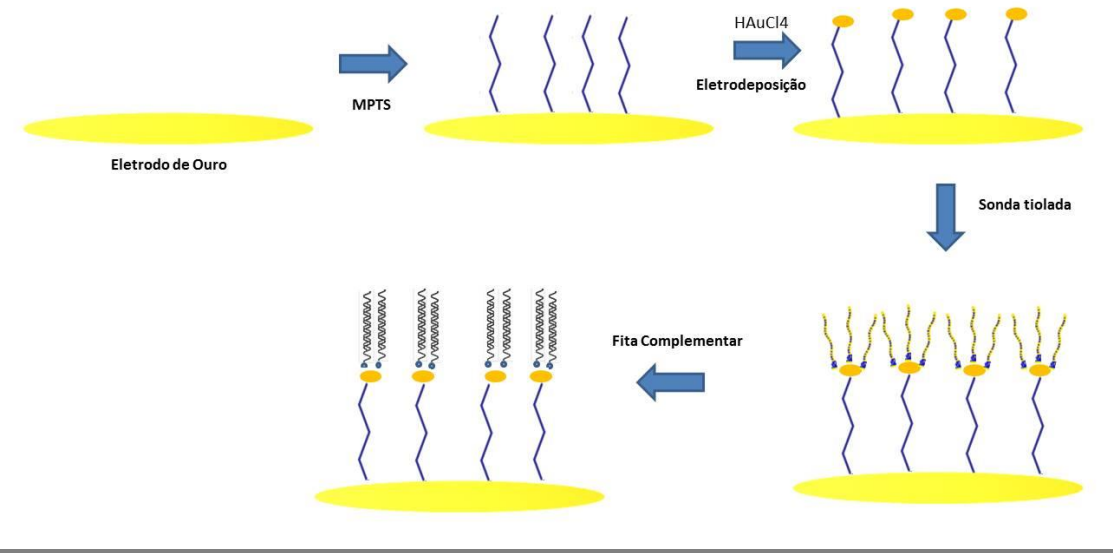


Figura 2

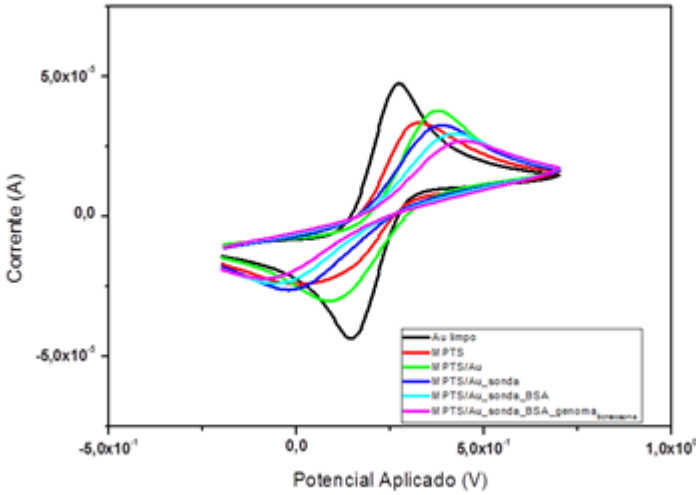
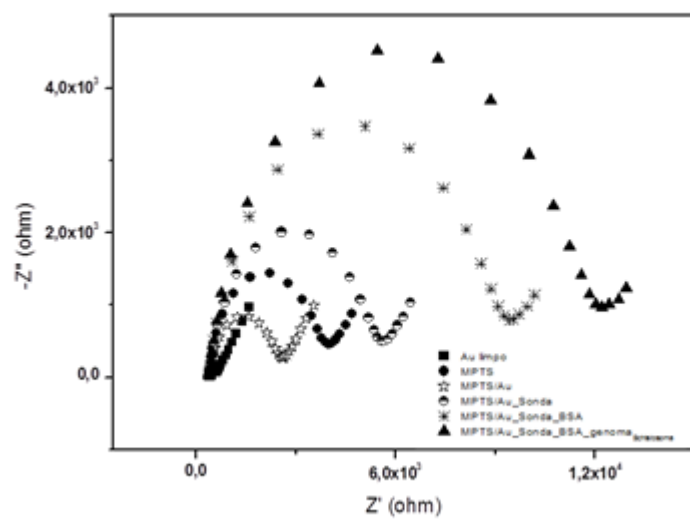


Figura 3



RESUMO

PLATAFORMA DE OURO ELETRODEPOSITADO PARA DETECÇÃO DO GENOMA DO VERME DE *SCHISTOSOMA MANSONI*

A presente invenção é resultado de uma metodologia simples para a obtenção de nanopartículas de ouro através da eletrodeposição direta do ouro na superfície do eletrodo e sua aplicação na elaboração de um dispositivo de diagnóstico focado em metodologias inovadoras em saúde com alta sensibilidade e especificidade para a detecção do *Schistosoma mansoni*. Assim, alcançamos uma técnica de preparação por meio de automontagem através da eletrodeposição de nanopartículas de ouro (NpsAu) sobre a superfície do eletrodo de ouro modificado com 3-mercaptopropiltrimetoxisilano (MPTS). As nanopartículas de ouro são usadas para imobilizar sondas de DNA tiolada na superfície do eletrodo, devido às suas propriedades, tais como reter a atividade biológica, condução eficiente do sinal eletroquímico entre transdutor e interface o que permite amplificar a resposta elétrica e o organosilano MPTS oferece monocamada auto-montada em ouro e age de forma comprovadamente eficiente entre a superfície do eletrodo. As técnicas de voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica foram úteis para o acompanhamento das etapas de modificação do eletrodo e observação da hibridação molecular por meio do indicador redox ferro-ferricianeto de potássio. O sistema biossensível desenvolvido apresenta a capacidade de detecção do genoma de *Schistosoma mansoni* em baixas concentrações prestando-se para a avaliação de pacientes com esquistossomose.

3.4 PATENTE II — MÉTODO DE BIODETECCÃO ELETROQUÍMICA DO GENOMA DE LEISHMANIA UTILIZANDO NANOPARTÍCULAS METÁLICAS DE ÓXIDO DE ZINCO

Patente depositada na POSITIVA-UFPE – Diretoria de inovação sob o nº:

COMUNICAÇÃO DE INVENÇÃO

2. Invento

Título proposto para a invenção (Máximo de 256 caracteres)

MÉTODO DE DETECÇÃO BIOELETROQUÍMICA DE LEISHMANIA CHAGASI BASEADA EM NANOPARTÍCULAS METÁLICAS DE ÓXIDO DE ZINCO

Caracterização da Invenção

- | | |
|---|---|
| ☒ (X) Um novo processo de fabricação. | ☒ (X) Um novo produto. |
| ☐ () Um novo composto químico. | ☐ () Um novo uso de um produto/processo já existente. |
| ☐ () Um novo aparelho ou máquina. | |
| ☐ () Uma nova biotecnologia. | |

MÉTODO DE DETECÇÃO BIOELETROQUÍMICA DE LEISHMANIA CHAGASI BASEADA EM NANOPARTÍCULAS METÁLICAS DE ÓXIDO DE ZINCO

Campo da Invenção

A presente invenção é aplicável à área do diagnóstico através do uso de biossensores eletroquímicos nanoestruturados, e refere-se a métodos e composições para identificação de patógenos. A invenção baseia-se na aplicação de uma sequência curta de oligonucleotídeos (sonda de DNA) ligadas quimicamente a nanopartículas metálicas de óxido de zinco aminadas (NpsZnONH_3) à superfície do eletrodo de ouro previamente modificado com a camada automontada de ácido 3-mercaptopropiônico (3-AMP) para detecção de patógenos em amostras com baixas concentrações. Em particular, na presente invenção, foi desenvolvido um genossensor para a identificação de sequências específicas do DNA de Leishmania em soro de humanos e cães.

As nanopartículas metálicas apresentam diversas aplicações tais como, possibilidade de atuar como carreadores para entrega controlada de fármacos, separação de proteínas e células, bem como no desenvolvimento de sensores eletroquímicos para o diagnóstico de diversas patologias. Outra aplicação para as partículas metálicas é o seu uso para a marcação de moléculas

biológicas, como por exemplo, anticorpos ou DNA, proporcionando também aplicações nas áreas médicas e veterinárias.

As nanopartículas de óxido de zinco (NpsZnO), apresentam um notável potencial de utilização devido a sua estabilidade física e química, alta capacidade oxidativa, baixo custo, alta disponibilidade e baixa toxicidade. Além disso, as NpsZnO possuem estabilidade a longo prazo, alta sensibilidade e confere provável aumento do sinal eletroquímico. O 3-AMP também foi utilizado já que ele constitui uma alternativa vantajosa, por ser um alcanotiol de cadeia curta, o que viabiliza a transferência de elétrons e diminui o tempo de formação de monocamadas. Além disso, o AMP possui grupos carboxílicos terminais o que viabiliza a imobilização de biomoléculas, seja pela interação eletrostática ou pela utilização de agentes químicos ativadores para a formação de ligação cruzada. Diante de suas propriedades, as nanopartículas de óxido de zinco e o ácido 3-mercaptopropiônico vêm sendo utilizados na montagem de plataformas sensoras.

Sumário

O invento aqui descrito é oriundo da aplicação de uma técnica simples para a obtenção de nanopartículas de óxido de zinco modificadas com o grupamento amina posteriormente ligadas a camada de 3-AMP e sua aplicação no

desenvolvimento de biossensores com elevada sensibilidade e especificidade para o diagnóstico da leishmaniose. Desta forma, descrevemos um método de preparação por meio da técnica de automontagem através da associação de NpsZnO/3-AMP sobre a superfície do eletrodo de ouro.

As nanopartículas da presente invenção têm áreas de superfície elevadas e propriedades físico-químicas únicas fazendo delas ideais para o desenvolvimento de sistemas de biossensoriamento. O uso das nanopartículas de óxido de zinco na preparação de biossensores eletroquímicos se deve às suas características, como o aumento significativo da seletividade a substâncias tóxicas, estabilidade física e química, alta capacidade oxidativa, baixo custo, alta disponibilidade e baixa toxicidade. Além disto, o 3-AMP proporciona o aumento da transferência de elétrons e a imobilização de biomoléculas na superfície do eletrodo.

Anterioridades: Estado da Técnica

A Leishmaniose é uma doença parasitária causada pelo *Lutzomya longipalpis* (mosquito palha), sendo uma doença importante no contexto da saúde pública brasileira, além ser encontrada em muitas regiões tropicais do mundo. A confirmação do diagnóstico da leishmaniose é tomada principalmente pelo diagnóstico direto que se baseia na detecção do parasito em secreções (microscopia direta). Algumas metodologias de teste de diagnóstico, tais

como ELISA, imunoenensaio de fluorescência indireta e PCR, são comumente usados para o seu diagnóstico. No entanto, estes métodos apresentam etapas adicionais de processamento de amostras e necessidade de pessoal técnico treinado. Por isso, o desenvolvimento de métodos sensíveis, rápidos e seletivos para a detecção da Leishmaniose é importante.

Recentemente, o uso de eletrodos nanoestruturados na área da química analítica vem se tornando uma tendência, a fim de melhorar a sensibilidade, seletividade e rendimento de sensores analíticos eletroquímicos e biossensores. Atribui-se o aumento do desempenho eletroanalítico de eletrodos nanoestruturados a sua alta condutividade, a grande área de superfície, a estabilidade e biocompatibilidade. Diferentes métodos de modificação de eletrodo são utilizados para aumentar a sua sensibilidade e especificidade atenuando assim os inconvenientes inerentes na detecção do analito.

As nanopartículas de óxido de zinco vêm sendo largamente empregadas no desenvolvimento de métodos para análises de amostras biológicas. Destacamos os numerosos métodos que têm sido desenvolvidos para a identificação de sequências de DNA tais como as técnicas ópticas, elétricas e gravimétricas. Todos estes procedimentos oferecem diferentes vantagens para a detecção de alvos específicos de sequência de DNA. Nos biossensores

as nanopartículas metálicas são utilizadas com bastante sucesso, pois possuem alta eficiência de imobilização, e devido a sua alta área superficial, as nanopartículas podem aumentar a quantidade de biomolécula imobilizada, consequentemente aumentando a sua sensibilidade.

Esforços vêm sendo empregados, com o objetivo de elaborar metodologias eficientes no desenvolvimento de biossensores, por exemplo, a patente Pat. WO 2014016465 A1, que se refere ao campo da biotecnologia, especificamente ao campo de biossensores, mais especificamente ao campo de biossensores com nanopartículas metálicas como sistema de transdução de sinal. Que resulta em sistemas muito sensíveis que podem ser usados em uma variedade de métodos de diagnósticos e analíticos, especialmente em biossensores.

O desenvolvimento de novas metodologias diagnósticas da leishmaniose tem atraído bastante atenção, por exemplo, a patente ES2356439 B1 que se refere ao uso de oligonucleotídeos de cadeia simples (aptâmeros) que são capazes de se ligar especificamente às proteínas histonas de microrganismos do gênero *Leishmania*, bem como às utilizações dos referidos oligonucleotídeos para o diagnóstico e tratamento de leishmaniose. Também são conhecidas as patentes Pat. EP2631300 A1, que divulga a construção de sondas de oligonucleotídeos altamente específicos que podem ser utilizados para a

identificação de *Leishmania* e, ao mesmo tempo para a conjugação com AuNPs. Em adição, as patentes WO2016005517A1; US 20120228155 A1, descrevem métodos de diagnóstico, seja baseado na detecção de DNA, seja pela utilização de moléculas alvo em fase líquida. A presente invenção difere das demais supracitadas porque nenhuma delas utiliza sistemas de biossensores com dispositivos nanoestruturados baseados em nanopartículas de óxido de zinco e 3-AMP no seu desenvolvimento.

A presente invenção mostra um processo de síntese e obtenção de nanopartículas de óxido de zinco modificadas com o grupamento amina e sua aplicação no desenvolvimento de biossensores eletroquímico visando sua utilização principalmente, mas não restrita, na área biomédica.

Muito embora tais documentos apresentem semelhança em relação a presente patente, as diferenças existentes podem ser observadas através da comparação entre esses documentos que pode ser visualizada na Tabela I abaixo.

Tabela I - comparação entre as componentes características de cada invento

		WO2014016465	ES2356439	WO 2015114506
	Invento apresentado	A1	B1	A2

Partícula metálica	Sim	Sim	Não	Sim
Polímero	Não	Não	Não	Não
Sequência de DNA	Sim	Não	Sim	Não
Anticorpos	Não	Não	Não	Sim
Nanopartícula de óxido de zinco aminada	Sim	Não	Não	Não

Problemas e Limitações do Estado da Técnica

O principal problema encontrado no estado presente da técnica é a limitação da quantidade da sonda de DNA imobilizada no genossensor, assim como da sensibilidade da sonda para a detecção desta hibridação. A fim de reverter esta situação e aumentar a quantidade de hibridação bem como a sensibilidade de sua detecção usamos os nanomateriais. As nanopartículas de óxido de zinco aminada foram utilizadas para fazer modificações na superfície do eletrodo, pois são indicadas para este fim devido a sua elevada

área superficial e excelentes propriedades eletroquímicas. Podemos assim desenvolver um dispositivo específico, de alta sensibilidade e economicamente viável.

Objetivos da Invenção

O objetivo da presente invenção é apresentar um biossensor eletroquímico nanoestruturado com nanopartículas de óxido de zinco aminada. A presente invenção evita e dispensa a necessidade de marcadores, uma vez que esta técnica revela alterações nas propriedades elétricas da superfície, tal como a corrente elétrica que têm uma resposta representativa a partir da presença da molécula alvo, sem marcadores.

A presente invenção também tem como objetivo o desenvolvimento de novos sistemas eletroquímicos em escala nanométrica para produção em larga escala e de baixo custo operacional.

Solução

O ato inventivo relacionado com a presente invenção é a obtenção de um biossensor eletroquímico modificado com nanopartículas de óxido de zinco aminada que fornecerá um diagnóstico rápido e preciso. Isso faz com que este dispositivo forneça a vantagem em comparação aos métodos atuais de

diagnóstico da leishmaniose e apresentar-se como uma técnica com economia de tempo e custo.

Vantagens

Uma das vantagens é a junção das propriedades elétricas e metálicas, proporcionando o desenvolvimento de dispositivos eletroquímicos mais eficientes, pois as combinações de distintas propriedades possibilitam potenciais aplicações

Por causa da sua simplicidade, a técnica da hibridação é a mais comumente usada nos diagnósticos laboratoriais do que o método de sequenciamento direto, na análise de sequência gênica específica. Na hibridação do DNA, a sequência gênica alvo é identificada por meio de uma sonda de DNA que forma um híbrido de dupla hélice com o seu ácido nucléico complementar, sendo esse reconhecimento altamente eficiente e específico. O Transdutor eletroquímico apresenta a vantagem de apresentar uma grande diversidade de suportes utilizados e pela facilidade de modificação dos mesmos. Após modificação com a sonda de DNA, o eletrodo então produzido, é capaz de detectar eletroquimicamente a molécula complementar de DNA, apresentando-se como uma promissora ferramenta para aplicação na área biomédica.

O biodispositivo da invenção mostra respostas satisfatórias frente a diferentes concentrações de DNA alvo na amostra analisada, além de ser de fácil manuseio, o que é uma vantagem, pois permite sua aplicação em laboratórios de análises clínicas, além de laboratórios de ensino e pesquisa.

A novidade e o efeito técnico alcançado

Resumindo, a novidade da presente invenção é a metodologia diagnóstica utilizando biossensores modificados com nanopartículas de óxido de zinco aminada, onde até o presente momento, não havia sido identificada por nenhuma outra instituição de pesquisa ou ensino ou mesmo descrito na literatura para o uso como sensor para Leishmaniose, já que os atuais métodos de detecção têm limitações, dentre elas: baixa sensibilidade, especificidade, alto custo, tempo elevado de diagnóstico; o atual método supera todas essas limitações para a detecção da doença, baseando-se na hibridação da fita complementar de DNA.

Descrição Detalhada

Os exemplos a seguir não têm o intuito de limitar o escopo da invenção, mas sim de somente ilustrar uma das inúmeras maneiras de se realizar a invenção. Resumidamente consegue-se chegar à invenção primeiramente pela síntese das nanopartículas de óxido de zinco aminada e sua ligação ao eletrodo de ouro previamente modificado com 3-AMP.

O procedimento seguido para preparar o biossensor foi o seguinte: O eletrodo de ouro foi polido com alumina $0,5\mu\text{m}$ e submetido à ultra sonicação por 1 minuto em água deionizada, e posteriormente seco com nitrogênio (N_2). Em seguida, o eletrodo de ouro foi submetido a um potencial de $-0,2\text{ V}$ para torná-lo catódico por 2 min. Posteriormente, o eletrodo foi imerso na solução de 3-AMP por 60 min ($4\mu\text{L}$), após isso se modificou a superfície com EDC:NHS (1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil-carbodiimida/ N-hidroxisuccinimida) por 15 min e ZnONH_3 por 20 min. Concluída essas etapas o sistema sensor foi exposto a amostra de PrimerLeishmania. Após obtenção do eletrodo modificado com AMP- ZnONH_3 -PrimerLeishmania este sistema foi submetido a incubação com o genoma de pacientes contaminados com genoma de *L. chagasi* (30min) diluídos em tampão fosfato de sódio (TFS) pH 7,4 (Fig.1, p.1). A lavagem foi executada com água deionizada após cada incubação. O exemplo a seguir mostra um caso mais específico de realização.

Exemplo 1. Síntese e caracterização das nanopartículas

Preparação de Nanopartículas

As nanopartículas foram obtidas da seguinte maneira: 1,5 g de óxido de zinco foi disperso em água destilada (50mL- pH 6,8), o pH inicial foi ajustado para 6,5 com ácido nítrico (HNO₃). A solução foi agitada durante 1 hora e 1 mL de 3- Aminopropiltriethoxilano (APTES) foi então acrescido a solução. Após adição do APTES o pH elevou-se para 9,7 por conta da propriedade básica dos grupamentos amino, e após alguns minutos estabilizou em 8,9. A solução ficou sob agitação por 24h horas, após isto, o excesso de APTES foi removido por filtração e lavagem com álcool e acetona. O pó foi seco a 60°C sob vácuo.

Caracterização das Nanopartículas

As análises impedimétricas e amperométricas foram realizadas com o auxílio de um potenciostato / galvanostato PGSTAT 128N (Autolab, Holanda), em uma célula eletroquímica de três eletrodos, imersos numa solução de 10 mM de ferro-ferricianeto de potássio $K_4[Fe(CN)_6]^{4-}/K_3[Fe(CN)_6]^{3-}$ na proporção (1:1) usada como uma sonda redox. A superfície do eletrodo de trabalho foi de ouro. Eletrodos de fio de platina e Ag / AgCl (solução saturada de KCl) foram usados como eletrodo auxiliar e de referência, respectivamente. Análise voltamétricas foram realizadas em um intervalo de

potenciais entre - 0,2 V e 0.7 V a uma velocidade de varredura de 50mVs-1 e os experimentos impedimétricos foram realizados a uma frequência entre 100 mHz e 100 kHz, com um potencial de 10 mV aplicado.

Características das nanopartículas

O artifício utilizado na construção do biodispositivo foi a imobilização de uma sequência específica do DNA de *Leishmania chagasi*, na superfície do eletrodo modificado com as nanopartículas que vai se ligar a sequência alvo através de processos de hibridação. Empregamos ainda diferentes concentrações deste DNA alvo que foram imobilizados para testar a sensibilidade do dispositivo aqui descrito.

A Fig. 2 (p.2) mostra os voltamogramas cíclicos do processo de montagem do biossensor, onde podemos observar no voltamograma em preto as correntes de picos anódicos (I_{pa}) e catódicos (I_{pc}) bem definidos (eletrodo limpo), o que é característico de um processo limitado por difusão. Depois da modificação do eletrodo foi observada uma diminuição acentuada destes picos, caracterizando assim a formação da camada orientada de 3-AMP (voltamograma vermelho). Posteriormente, foram adicionadas as NpsZnONH₃ juntamente com EDC:NHS, onde observa-se um novo

decréscimo nas respostas amperométricas, comprovando assim a eficiente aderência das nanopartículas à superfície do eletrodo (voltamograma azul). Com a imobilização do primer da leishmania, ocorreu nova diminuição destas correntes, em decorrência à repulsão eletrostática entre o par redox e a sonda de DNA na superfície do eletrodo (voltamograma verde), comprovando assim a ligação e formação da camada sensora AMP-ZnNH₃-PrimerLeishmania. Para a avaliação da ação do sistema sensor AMP-ZnNH₃-PrimerLeishmania foi avaliada uma amostra contendo o DNA alvo, e após incubação foi observado o processo de hibridação, isto faz com que haja uma nova diminuição nas correntes de picos anódicos e catódicos como observado no voltamograma em rosa. Este processo reflete a presença de fitas complementares à sonda da camada sensora, demonstrando o reconhecimento específico do sensor desenvolvido. As análises foram realizadas numa faixa de potencial de -0,2 a 0,7V.

Através da Espectroscopia de Impedância Eletroquímica, também é possível observar o processo de modificação da superfície do eletrodo de trabalho, onde as modificações são comprovadas pelo aumento do diâmetro do semicírculo do diagrama de Nyquist, sendo este aumento relacionado ao incremento na Resistência à transferência de Carga (RCT). O eletrodo sem

modificações em sua superfície apresenta gráfico com um comportamento quase linear devido o processo ser limitado por difusão, ao adicionar o 3-AMP à superfície do biossensor ocorre um nítido aumento do diâmetro do semicírculo quando comparado com o eletrodo sem modificação, esta característica se mantém à medida que as camadas vão sendo acrescidas ao dispositivo, refletido pelo aumento gradual de sua resistência para o sistema ZnNH₃-PrimerLeishmania como para o sistema após reconhecimento ZnNH₃-PrimerLeishmania-Genoma o que corrobora com as análises de voltametria cíclica. As modificações que ocorrem na superfície do eletrodo e o processo de hibridação levam a um bloqueio na transferência de elétrons do par redox ferro-ferricianeto de potássio para a superfície do eletrodo. Desta forma, estes eventos levam a alterações no diâmetro do semicírculo visíveis no gráfico de Nyquist.

O processo de bioreconhecimento do biossensor frente as amostras clínicas de cães infectados (DNA) também foi analisado. Foram analisadas uma amostra concentrada (0.5ng) e a mesma diluída em várias concentrações (1,0ng/0,1ng/0,01ng/0,001ng/0,0001ng/mL), mostrando assim a viabilidade e sensibilidade de utilização do sistema sensor. Foi possível avaliar por meio das respostas dos voltamogramas cíclicos, que quanto mais concentradas as amostras, menores são as correntes de pico anódicas e catódicas, mostrando

que quando aplicado o potencial sobre o eletrodo de trabalho, há um maior impedimento de passagem da corrente de elétrons.

Referências:

Souto D.E., Silva J.V., Martins H.R., Reis A.B., Luz R.C., Kubota L.T. and Damos F.S., Development of a label-free immunosensor based on surface plasmon resonance technique for the detection of anti- *Leishmania infantum* antibodies in canine serum, *Biosen Bioelectron* 46:22-29 (2013).

Diniz L.M.O., Duani H., Freitas C.R., Figueiredo R.M. and Xavier C.C., Neurological involvement in visceral leishmaniasis: case report, *Rev Soc Bras Med Trop* 43:743-745 (2010).

Drummond TG, Hill MG and Barton JK, Electrochemical DNA sensors, *Nat Biotechnol* 21:1192-1199 (2003).

Xue D, Elliott CM, Gong P, Grainger DW, Bignozzi CA and Caramori S, Indirectelectrochemical sensing of DNA hybridization based on the catalytic oxidation of cobalt(II), *J Amer Chem Soc* 129:1854-1855 (2007).

Ravindranadh K and Rao MC, Physical properties and applications of conducting polymers: An Overview, Int J Adv Pharm Biol Chem 2:190-200 (2013).

REIVINDICAÇÕES

1. MÉTODO DE DETECÇÃO BIOELETROQUÍMICA DE LEISHMANIA CHAGASI BASEADA EM NANOPARTÍCULAS METÁLICAS DE ÓXIDO DE ZINCO, caracterizado por ser um biossensor a conter as seguintes partes: a) molécula de reconhecimento (sequência de Ácido nucléico), b) suporte onde será feita a imobilização das moléculas, c) fonte de corrente elétrica, d) Nanopartículas metálicas de óxido de zinco (NpsZnO) e) Ácido 3-Mercaptopropiônico (AMP).
2. MÉTODO DE DETECÇÃO BIOELETROQUÍMICA DE LEISHMANIA CHAGASI BASEADA EM NANOPARTÍCULAS METÁLICAS DE ÓXIDO DE ZINCO, de acordo com reivindicação 1, caracterizado pela detecção do analito através da análise das interações interfaciais do eletrodo.
3. MÉTODO DE DETECÇÃO BIOELETROQUÍMICA DE LEISHMANIA CHAGASI BASEADA EM NANOPARTÍCULAS METÁLICAS DE ÓXIDO DE ZINCO, conforme reivindicação 1 e 2 caracterizado pela presença de nanopartículas metálicas sobre a superfície modificada com Ácido 3-Mercaptopropiônico obtidas através de um processo de automontagem.
4. MÉTODO DE DETECÇÃO BIOELETROQUÍMICA DE LEISHMANIA CHAGASI BASEADA EM NANOPARTÍCULAS METÁLICAS DE ÓXIDO DE ZINCO, de acordo com as reivindicações 1, 2, 3 caracterizado por basear-se na aplicação de uma sonda de DNA em nanopartículas metálicas e assim permitir detecção de patógenos em amostras com baixas concentrações, em particular foi desenvolvido um

genossensor para a identificação do DNA da Leishmania em amostras de pacientes infectados e cães.

5. MÉTODO DE DETECÇÃO BIOELETROQUÍMICA DE LEISHMANIA CHAGASI BASEADA EM NANOPARTÍCULAS METÁLICAS DE ÓXIDO DE ZINCO, conforme reivindicação 1, caracterizada pelo fato da referida superfície de suporte ser de ouro o que proporciona uma maior condutibilidade elétrica e biocompatibilidade ao dispositivo facilitando assim a interações moleculares.

6. MÉTODO DE DETECÇÃO BIOELETROQUÍMICA DE LEISHMANIA CHAGASI BASEADA EM NANOPARTÍCULAS METÁLICAS DE ÓXIDO DE ZINCO, conforme reivindicações 1-5, caracterizado pelo fato de que o referido compósito apresenta um núcleo formado por óxido de zinco que se liga à superfície do eletrodo de ouro devido a presença de ácido mercaptopropiônico, o qual disponibiliza grupo -COOH para interação covalente com grupo -NH_3 presentes na superfície da nanopartículas de óxido de zinco.

7. MÉTODO DE DETECÇÃO BIOELETROQUÍMICA DE LEISHMANIA CHAGASI BASEADA EM NANOPARTÍCULAS METÁLICAS DE ÓXIDO DE ZINCO, caracterizado pela modificação camada a camada da superfície do biodispositivo seguida da análise voltamétrica e impedimétrica ao término de cada etapa de modificação e a lavagem executada com água deionizada após cada período de incubação.

8. MÉTODO DE DETECÇÃO BIOELETROQUÍMICA DE LEISHMANIA CHAGASI BASEADA EM NANOPARTÍCULAS METÁLICAS DE ÓXIDO DE ZINCO, de acordo com as reivindicação 1, 2, 3 e 7 caracterizado pelo método de detecção eletroquímica por meio Voltametria Cíclica e Espectroscopia de Impedância Eletroquímica.

9. MÉTODO DE DETECÇÃO BIOELETROQUÍMICA DE LEISHMANIA CHAGASI BASEADA EM NANOPARTÍCULAS METÁLICAS DE ÓXIDO DE ZINCO, conforme reivindicação 6, conforme reivindicação 6, caracterizado pela exposição do grupamento tiol pelo AMP.

10. MÉTODO DE DETECÇÃO BIOELETROQUÍMICA DE LEISHMANIA CHAGASI BASEADA EM NANOPARTÍCULAS METÁLICAS DE ÓXIDO DE ZINCO, conforme reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que o grupamento tiol expostos pelo AMP é importante para a posterior ancoragem das nanopartículas.

11. MÉTODO DE DETECÇÃO BIOELETROQUÍMICA DE LEISHMANIA CHAGASI BASEADA EM NANOPARTÍCULAS METÁLICAS DE ÓXIDO DE ZINCO conforme reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que a sonda imobilizada na superfície da nanopartícula é uma sequência específica do material genético da *Leishmania chagasi*, proporcionando ao referido biossensor uma alta especificidade da resposta.

12. MÉTODO DE DETECÇÃO BIOELETROQUÍMICA DE LEISHMANIA CHAGASI BASEADA EM NANOPARTÍCULAS METÁLICAS DE ÓXIDO DE ZINCO, conforme reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que a referida análise é feita numa faixa de potencial de -0.2V e 0.7 V e numa faixa de frequência de 100 mHz e 100 kHz respectivamente.

13. MÉTODO DE DETECÇÃO BIOELETROQUÍMICA DE LEISHMANIA CHAGASI BASEADA EM NANOPARTÍCULAS METÁLICAS DE ÓXIDO DE ZINCO caracterizado pelo uso da nanopartícula de óxido de zinco em biossensores abrangendo ao menos um agente imobilizador, no mínimo um agente ativador das ligações moleculares, para a elaboração de ferramentas para uso diagnóstico.

14. MÉTODO DE DETECÇÃO BIOELETROQUÍMICA DE LEISHMANIA CHAGASI BASEADA EM NANOPARTÍCULAS METÁLICAS DE ÓXIDO DE ZINCO caracterizado pelo uso da nanopartícula de óxido de zinco em biossensores,

conforme reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que o referido dispositivo é um genossensor eletroquímico.

15. MÉTODO DE DETECÇÃO BIOELETROQUÍMICA DE LEISHMANIA CHAGASI BASEADA EM NANOPARTÍCULAS METÁLICAS DE ÓXIDO DE ZINCO caracterizado pelo uso da nanopartícula de óxido de zinco em biossensores modificados com oligonucleotídeo para elaboração de biossensores e biodispositivos.

Figura 1

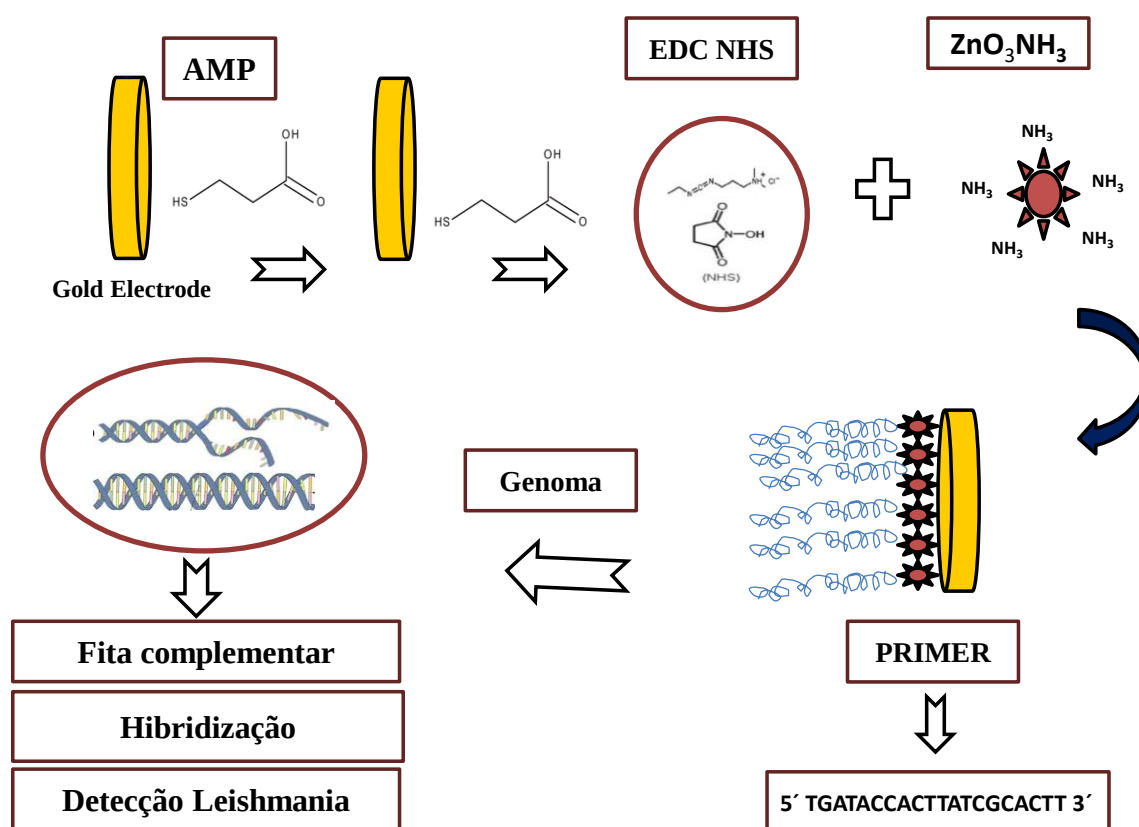
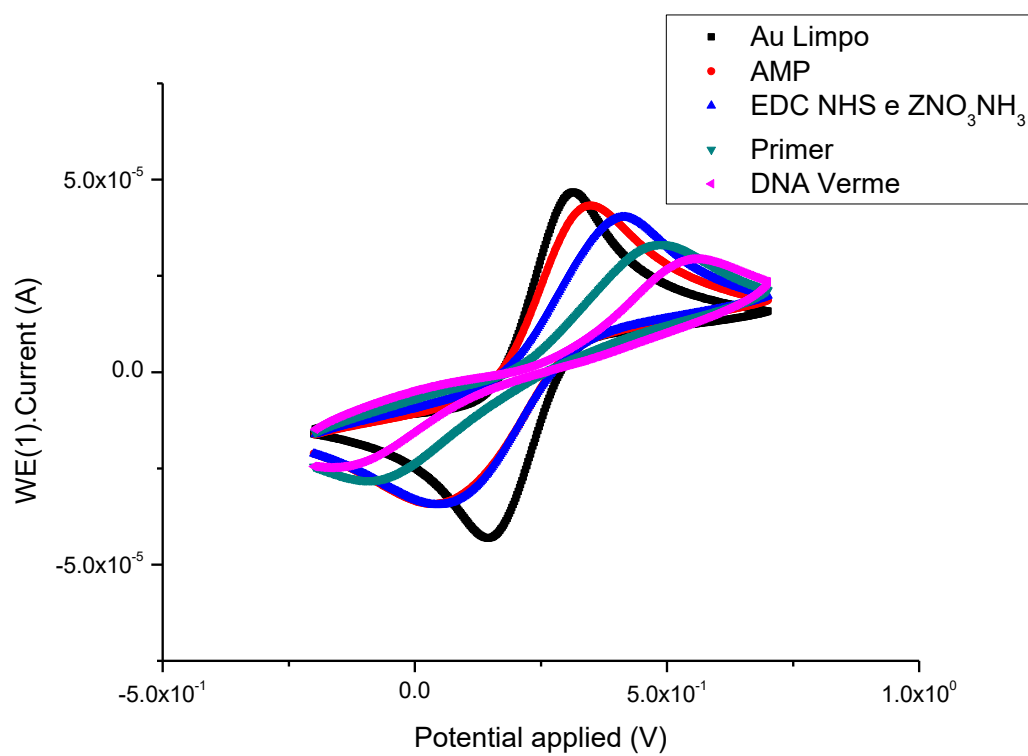


Figura 2



RESUMO

MÉTODO DE DETECÇÃO BIOELETROQUÍMICA DE LEISHMANIA CHAGASI BASEADA EM NANOPARTÍCULAS METÁLICAS DE ÓXIDO DE ZINCO.

A presente invenção é oriundo da aplicação de uma técnica simples para obtenção de nanopartículas metálicas. É uma metodologia aplicável à área do diagnóstico através do uso de biossensores eletroquímicos nanoestruturados, e refere-se a métodos e composições para identificação de patógenos. A invenção baseia-se na aplicação de uma sequência curta de oligonucleotídeos (sonda de DNA) ligados eletrostaticamente a superfície de nanopartículas de óxido de zinco (NpsZnO) sobre a superfície de ouro modificada com ácido 3-mercaptopropiônico (AMP) para detecção em amostras com baixas concentrações. As técnicas de voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica foram úteis para o acompanhamento das etapas de modificação do eletrodo e observação da hibridação molecular por meio do indicador redox ferro-ferricianeto de potássio. Em particular, na presente invenção, foi desenvolvido um genossensor para a identificação de sequências específicas do DNA da *Leishmania chagasi* em amostras de cães infectados prestando-se para futura avaliação de pacientes com leishmaniose.

4 CONCLUSÃO

- Novos biossensores eletroquímicos para detecção de DNA de *S.mansoni* e *L. chagasi* foram desenvolvidos com sucesso. A resposta de ambos os genossensores foram significativas e apresentou linearidade proporcional a concentração;
- A técnica de detecção eletroquímica de DNA foi ser capaz de detectar o genoma de *S.mansoni* e *L. chagasi* sem necessidade de marcação (label free);
- A plataforma sensora desenvolvida foi eficaz na detecção de *S. mansoni* em LCR, urina e soro e *L. chagasi* em soro.
- A plataforma desenvolvida mostrou um limite de detecção (LOD) de $0,6 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ para detecção do *S. mansoni* e $1 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ para detecção da *L. chagasi*. Portanto, o biossensor obtido pode ser considerado como um instrumento útil para a detecção específica de DNA destes parasitas em baixas concentrações.
- Estes resultados confirmaram que esta abordagem de detecção fornece uma maneira sensível e eficiente para a detecção de *S. mansoni* e *L. chagasi*.
- O genossensor aqui exposto apresenta-se como uma ferramenta promissora para o diagnóstico eficiente da esquistossomose e da leishmaniose visceral.

REFERENCIAS

- ALVES, W. A.; BEVILACQUA, P. D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 20, n. 1, p. 259-265, 2004.
- ANDRADE FILHO, A. S.; QUEIROZ, A. C.; REIS, M. G.; AMARAL, R. M.; BRITO, R. M. Neuroesquistossomose. **Rev. Neuro. Psiq.** 2015 Set./Dez;19(Ed. Especial):165-209.
- AROTIBA, O., A.; IGNASZAK, A.; MALGAS, R.; AHMED, A., A.; BAKER, P.,G.,L.; MAPOLE, S.F.; IWUOHA, E.I.; An electrochemical DNA biosensor developed on novel multinuclear nickel (II) salicylalimine metallodendrimer platform. **Electrochimica Acta**, 53:4; 1689-169, 2007.
- ARRUDA, M. M. Leishmanioses. In. Programa de Zoonoses Região Sul. Manual de Zoonoses. 1. **Ed. Curitiba**: [s.n.], 2009. P. 68-90.
- ARTEAGA, K. A.; RODRIGUEZ, J. A.; BARRADO, E. Magnetic solids in analytical chemistry: a review. **Analytica Chimica Acta** 2010, 674, 157–165
- 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
- ARYA, S.K.; SAHA, S.; RAMIREZ-VICK, J.E.; GUPTA, V.; BHANSALI, S.; SINGH, S.P. Analytica Chimica Acta Recent advances in ZnO nanostructures and thin films for biosensor applications : **Review. Anal Chim Acta**. 2012;737:1–21
- BANSI D MALHOTRA E ANTHONY P F TURNER. Advances in Biosensors, **Elsevier Science**, vol. 5, 2003.

BARBERO, G; ALEXE-LONESCU, A; LELIDIS, I. Significance of small voltage in impedance spectroscopy measurements on electrolytic cells. **J Appl Phys** 98(11): 113703, 2005.

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.

BARBOSA, C.S; GOMES, E.C.S; MARCELINO, J.M.R; CAVALCANTE, K.R.L.J; NASCIMENTO, W.R.C. Quality control of the slides by Kato-Katz method for the parasitological diagnosis of schistosomiasis infection by *Schistosoma mansoni*. **J Bras Patol Med Lab**, v. 53, n. 2, p. 110-114, 2017.

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

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

BARRETO, M.L.; TEIXEIRA, M.G.; BASTOS, F.I.; XIMENES, R.A.A.; BARATA, R.; RODRIGUES, L.C. Sucessos e fracasso no controle de doenças infecciosas no Brasil: o contexto social e ambiental, políticas, intervenções e necessidades de pesquisa. **The Lancet - Saúde no Brasil**. Mai 2011.

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

BENITES, T. A.; RIBEIRO, W. C.; GÓES, M. S.; FERREIRA, A. A. P.; BUENO, P.R. Efeitos da rugosidade superficial nas propriedades de passivação de monocamadas orgânicas automontadas. **Quim. Nova**, Vol. 37, No. 9, 1533-1537, 2014

BERGGREN, C.; BJARNASON, B.; JOHANSSON, G. An immunological Interleukine-6 capacitive biosensor using perturbation with a potentiostatic step. **Biosens. Bioelectron.** 1998, 13, 1061–1068

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

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.

BOJORGE RAMIREZ, N. I.; SALGADO, A. M.; VALDMAN, B. Amperometric immunosensor for detecting *Schistosoma mansoni* antibody. *Assay Drug Dev Technol.* 2007 Oct;5(5):673-82.

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

BOUJAKHROUT, A.; DÍEZ, P.; SÁNCHEZ, A.; MARTÍNEZ-RUÍZ, 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)

BRAGA BP; DA COSTA JUNIOR LB; LAMBERTUCCI JR. Magnetic resonance imaging of cerebellar schistosomiasis mansoni. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 36: 635-636, 2003.

BRASIL. **Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana** / Organização: Gerência Técnica de Doenças Transmitidas por Vetores e Antropozoonoses. - Coordenação de Vigilância Epidemiológica - Centro Nacional de Epidemiologia – Fundação Nacional de Saúde - Ministério da Saúde Brasília – 2000

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 e controle da mielorradiculopatia esquistossomótica** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 32 p. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos)

BRASIL. Ministério da Saúde (MS). **Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS)**. Leishmaniose visceral grave: normas e condutas. Brasília, 2006a (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

BRASIL. Ministério da Saúde (MS). Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS). **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2. ed. Brasília, 2007

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. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso**/ Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 8. ed. rev. – Brasília : Ministério da Saúde, 2010 a.

BRASIL. Departamento de Ciências e Tecnologia. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. **Doenças negligenciadas: estratégias do Ministério da Saúde**. Rev Saúde Pública 2010b;44(1):200-2

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 c.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Sistema de Informação do Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose** –SIPCE, 2011. 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, 2014a. 144 p. : il.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 1. ed., 5. reimpr. – Brasília : Ministério da Saúde, 2014b. 120 p.: il.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema de Notificação de Agravos à Saúde. **Letalidade de Leishmaniose Visceral**. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 2000 a 2015. Brasília: Ministério da Saúde, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento de Epidemiologia em Serviços. **Guia de vigilância em Saúde: volume único**[recurso eletrônico]/ Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Coordenação-Geral de Desenvolvimento de Epidemiologia em Serviços. – 2. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 2017. 705 p. : il.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Doenças negligenciadas no Brasil: vulnerabilidade e desafios. In BRASIL. Ministério da Saúde. Saúde Brasil 2017. **Uma análise da situação de saúde e os desafios para o alcance dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável**. Brasília: Ministério da Saúde, 2018.

BRETT, A. (1993). Eletroquímica: Princípios, Métodos e Aplicações. Coimbra: **Livraria Almeida**, 444p.

BRISSON, R. T.; RODRIGUES, F. S. G.; CARVALHO NETO, J. A. R.; EDUARDO, A. S.; TEIXEIRA, F. C. M.; BONATTI, R. C.F.; FERNANDEZ, A. L.; OLIVEIRA, C. C. H. B. Schistosomal myeloradiculopathy associated with hepatitis B virus infection: a case report. **Rev Med** (São Paulo). 2014 out.-dez.;93(4):172-8.

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

CABRAL-MIRANDA, G.; DE JESUS, J. R.; OLIVEIRA, P. R. S.; BRITTO, G. S. G.; PONTES-DE-CARVALHO, L. C; DUTRA, R. F.; ALCÂNTARA-NEVES N. M. Detection of Parasite Antigens in *Leishmania infantum*-Infected Spleen Tissue by Monoclonal Antibody-, Piezoelectric-Based Immunosensors. **Journal of Parasitology**: February 2014, Vol. 100, No. 1, pp. 73-78. 2014

CALDAS, A.J.M; AQUINO, D.M.C; FERREIRA, N.V; SILVA, M.A.P; COSTA, A.S.A; BARRAL, A.P. Avaliação imunológica da intradermoreação de Montenegro. **Rev Pesq Saúde**,11(2): 9-13, maio-ago, 2010

CAMARGO, E.P. Doenças tropicais. **Estud Av.**, 22, (64):95-110. 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/ea/v22n64/a07v2264.pdf>

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, L. A.; ANDRADE, A. R.; BUENO, P. R. Espectroscopia de impedância eletroquímica aplicada ao estudo das reações heterogêneas em ânodos dimensionalmente estáveis. **Quím. Nova** vol.29. 2006.

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

CARVALHO, A.T., MARTINS FILHO, A.O., OLIVEIRA, R.C. A resposta imune na forma crônica da esquistossomose mansoni. In: Carvalho OS, Coelho PMZ, Lenzi HL, (editores). *Schistosoma mansoni* e esquistossomose: uma visão multidisciplinar. 20ª ed. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2008d. p. 670-716.

CAVALCANTI, M.G., FERNANDES, E.F., CARVALHO, M.A., et al. Imunologia. In: Huggins DW, Siqueira-Batista R, Medeiros LB, et al. (editores). *Esquistossomose mansoni*. São Paulo: **Grupo Editorial Moreira Jr**; 1998. p. 33-8.

CESIULIS, H; TSYNTSARU, N; RAMANAVICIUS, A; RAGOISHA, G. The study of thin films by electrochemical impedance spectroscopy. In: Tiginyanu, I; Topala, P; Ursaki, V. (eds). *Nanostructures and Thin Films for Multifunctional Applications*. **Springer**, Cham, Switzerland, 2016, pp. 3-42

CHAKI, N. K.; ASLAM, M.; SHARMA, J.; VIJAYAMOHANAN, K. Applications of self-assembled monolayers in materials chemistry *Proc. - Indian Acad. Sci., Chem. Sci.* 2001, 113, 659.

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

CHEN, G., NING, X., PARK, B., BOONS, G.-J., & XU, B. (2009). Simple, clickable protocol for atomic force microscopy tip modification and its application for trace ricin detection by recognition imaging. **Langmuir**, 25(5), 2860-2864

CHEN, A.W.Y., ALAM, M.H., WILLIAMSON, J.M.L., BRAWN, L.A.,. An unusually late presentation of neuroschistosomiasis. **J. Infect.** 53, 2006. 155–158.

CHEN, X; GAMBHIR, S.S; CHEON, J.Theranostic Nanomedicine. cc. **Chem. Res.** 2011, 44, 10, 841-841

CHEN, M; HOU, C; HOU, D; BAO, J; SHEN, C. An electrochemical DNA biosensor based on nitrogen-doped graphene/Au nanoparticles for human multidrug resistance gene detection. **Biosensors and Bioelectronics**, 8515, 2016, 684-691

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

CHIAPPETTA-FILHO, E.J.D. Projeto e Fabricação de um Sistema Sensor de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica.2014. 143f. **Dissertação** (mestrado em engenharia elétrica) Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação da Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2014

CHIORCEA, A.M; BRETT, A.M. Atomic force microscopy characterization of an electrochemical DNA-biosensor. **Bioelectrochemistry** 63 (2004) 229– 232

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.

CHU, X.; XIANG, Z.F.; FU, X.; WANG, S.P.; SHEN, G.L.; YU, R.Q. Silver-enhanced colloidal gold metalloimmunoassay for Schistosoma japonicum antibody detection, **Journal of immunological methods**, 301(2005) 77-88.

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

CROW, D. R. Principles and Applications of Electrochemistry, **Chapman & Hall**, London, 1994.

D'ORAZIO, P. Biosensors in clinical chemistry. **Clinica Chimica Acta**. v.334, n. 1-2, p. 41-69, 2003.

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.

DANIELS, J. S; POURMAND, N. Label-Free Impedance Biosensors: Opportunities and Challenges. **Electroanalysis**. 19, 2007, 1239-1257

DECLARAÇÃO DA AMÉRICA LATINA E CARIBE PARA A SEXTA EDIÇÃO DO FÓRUM MUNDIAL DA CIÊNCIA. RIO DE JANEIRO, 2013. Disponível em http://www.sbpnet.org.br/site/arquivos/arquivo_369.pdf (acesso em 25 nov. 2018).

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

DIETZE, R; CARVALHO, SFG. Medicina Tropical. 1^a ed. Capítulo 5; **Editora Atheneu**, São Paulo: 2003

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

ECKERMAN, A. L et al. Electrochemistry of redox active self assembled monolayers. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 254, n. 15/16, p. 1769-1802. 2010.

ELMAHALLAWY, E. K. et al. Diagnosis of leishmaniasis. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 8, n. 08, p. 961-972, 2014.

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

FANGA, X; TANA, O. K; TSEA, M. S; OOI, E. E. A label-free immunosensor for diagnosis of dengue infection with simple electrical measurements **Biosensors and Bioelectronics** 25 (2010) 1137–1142

FERRARI T.C.A.; DRUMMOND S.; REIS, M.G.. Neuroesquistossomose. In: CARVALHO, O, S.; COELHO, Paulo Marcos Zech; LENZI, Henrique Leonel (orgs.). Schistosoma mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: **Fiocruz**, 2008, p. 807-820.

FERRARI, T. C. A., MOREIRA, P. R.R. Neuroschistosomiasis: clinical symptoms and pathogenesis. **The lancet**, v.10, p. 853-864, 2011.

FERRARI, T. C. A.; MOREIRA, P. R. R.; CUNHA, A. S. Clinical characterization of neuroschistosomiasis due to Schistosoma mansoni and its treatment. **Acta Tropica, Base**, v. 108, n. 2-3, p. 87-97, 2008.

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

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

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.

FRIAS, I.A.M; ANDRADE, C.A.S; BALBINO, V.Q; MELO, C.P. Use of magnetically disentangled thiolated carbon nanotubes as a label-free impedimetric genosensor for detecting canine Leishmania spp. infection. **Carbon**, 117, 2017, 33-40

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.

GAMBURG, Y. D.; ZANGARI, G. Introduction to Electrodeposition: Basic Terms and Fundamental Concepts. In: **Theory and Practice of Metal Electrodeposition**. 1a. ed. Nova Iorque: Springer Science, 2015. v. 1p. 1-24.

GAO, F; FAN, T; OU, S; WU, J; GENG, D. Highly efficient electrochemical sensing platform for sensitive detection DNA methylation, and methyltransferase activity based on Ag NPs decorated carbon nanocubes. **Biosensors and Bioelectronics**, 9915, 2018, 201-208

GARCIA, L.P.; MAGALHÃES, L. C.G.; AUREA, A. P.; SANTOS, C. F.; ALMEIDA, R. F. Epidemiologia das doenças negligenciadas no Brasil e gastos federais com Medicamentos. Texto para discussão1607. Ipea. 2011

G-FINDER. **G-finder 2018 Policy Cures Research**, 2018. Disponível em: <<https://www.policycuresresearch.org/g-finder-2018/>>. Acesso em: 19 mar. 2020

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 systemfor detection of Schistosoma infection in feces. **PLoS Negl. Trop. Dis.** 4, 2010e664.

GOMES, Y.M.; CAVALCANTI, M.P.; LIRA, R.A.; ABATH, F.G.; ALVES, L.C. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biothechnological advances. **The veterinary journal**, Jan: 175(1):45-52, 2008.

GONG, Q; WANG, Y; YANG, H. A sensitive impedimetric DNA biosensor for the determination of the HIV gene based on graphene-Nafion composite film. **Biosens Bioelectron.** 2017;89:565-569.

GONTIJO, C. M.; MELO, M.N. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, 7(3): 338-49, 2004

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

GUISEPPI-ELIE, A.; GHEORGE, M. Electrical frequency dependent characterization of DNA hybridization. **Biosensors and Bioelectronics**. v. 19, n. 2, p. 95-102, 2004.

GUO, S.; WANG, E. **Synthesis and electrochemical applications of gold nanoparticles**. *Analytica Chimica Acta* 598 (2007) 181–192

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.

HONG C-H, HSIEH C-F, TSENG C-S, HUANG W-C, GUO C-Y, LIN S, LEE S-C, A nanobiosensing method based on force measurement of antibody-antigen interaction for direct detection of enterovirus 71 by the chemically modified atomic force microscopic probe, **Microbial Pathogenesis** (2017), doi: 10.1016/j.micpath.2017.08.051.

HER, S., JAFFRAY, D. A., & ALLEN, C. Gold nanoparticles for applications in cancer radiotherapy: Mechanisms and recent advancements. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 109, 84–101. 2015.

HERRMANN, P. S. P.; SILVA, M. A. P.; FO, R. B.; JOB, A E.; COLNAGO, L. A.; FROMMER, J. E.; MATTOSO, L. H. C. **Microscopia de Varredura por Força: uma Ferramenta Poderosa no Estudo de Polímeros**. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 1997.

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

INGEBRANT, I; HAN, Y; NAKAMURA, F; POGHOSSIAN, A. Label-free detection of single nucleotide polymorphisms utilizing the differential transfer function of field-effect transistors. **Biosensors & Bioelectronics** 22(12):2834-40, 2007

IKEDA-GARCIA, F. A.; FEITOSA, M. M. Métodos de diagnóstico da leishmaniose visceral canina. **Clínica Veterinária**, São Paulo, n. 62, p. 32-38, 2006.

JENKINS-HOLICK, D. S.; KAUL, T. L. (2013). Schistosomiasis. *Urol. Nurs.* 33, 163-170.

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

JIN, H; XING, X; ZHAO, H; CHEN, Y. Detection of erythrocytes influenced by aging and type 2 diabetes using atomic force microscope. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 391(4):1698-702.2010

KAITTANIS,C.; SANTRA, S.; PEREZ, J.M. **Emerging nanotechnology-based strategies for the identification of microbial pathogenesis**, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 62 (2010) 408–423

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

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

KLEO, K. et al. Detection of vaccinia virus DNA by quartz Crystal microbalance. *Analytical Biochemistry*, v.418, n.2, p.260-266, 2011.

KONGS, A, MARKS, G, VERLÉ, P, VAN DER STUYFT P. The unreliability of the Kato-Katz technique limits its usefulness for evaluating *S. mansoni* infections. **Trop Med Int Health** 2001; 6(3):163-9.

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

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

LABUDA, J.; BRETT, A.M.O.; EVTUGYN, G.; FROJTA, M.; MASCINI, M.; OZSOZ, M.; PALCHETTI, I.; PALECEK, E.; WANG, J. Electrochemical nucleic acid-based biosensors: Concepts, terms and methodology (IUPAC Technical Report)*. Pure and Applied Chemistry, v.82, n,5, p. 1161-1187, 2010.

LACZKA O, BALDRICH E, MUNOZ FX, DEL CAMPO FJ. Detection of Escherichia coli and Salmonella typhimurium using interdigitated microelectrode capacitive immunosensors: the importance of transducer geometry. **Anal. Chem.** 80:7239–47 2008

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.

LAMBERTUCCI, J.R; SILVA, L.C.S; AMARAL, R.S. Guidelines for the diagnosis and treatment of schistosomal myeloradiculopathy. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 2007 set-out;40(5):574-581.

LAURENTI, MD. Patologia e Patogenia das leishmanioses. **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo, 2010

LAURENTI, M. D.; ROSSI, C. N.; MATTA, V. L. R.; TOMOKANE, T. Y.; CORBETT, C. E. P.; SECUNDINO, N. F. C.; PIMENTA, P. F. P.; MARCONDES, M. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit Leishmania (Leishmania) infantum chagasi to the natural vector. **Veterinary Parasitology**, v. 196, n. 3-4, p. 296-300, 2013.

LEI, C.X; GONG, F.C; SHEN, G.L; YU, R.Q. Amperometric immunosensor for *Schistosoma japonicum* antigen using antibodies loaded on a nano-Au monolayer modified chitosan-entrapped carbon paste electrode. **Sensor and Actuators B: Chemical**. 96, (31), 2003. 582-588

LEITE, C. E. A. Leishamiose Visceral Humana em Pernambuco: Epidemiologia e Gastos com Internações Hospitalares. **Dissertação** (Gestão e Economia da Saúde). Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2016.

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, C.Z; LIU, Y; LUONG, J.H. Impedance sensing of DNA binding drugs using gold substrates modified with gold nanoparticles. **Analytical Chemistry**. 77 (2), 478-485, 2005

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, G.; MIAO, P. Theoretical Background of Electrochemical Analysis. **SpringerBriefs in Molecular Science**, p. 5-18, 2013.

LICHTENBERGOVA, L., KOLBEKOVA, P., KOURILOVA, P., et al. Antibody responses induced by *Trichobilharzia regenti* antigens in murine and human hosts exhibiting cercarial dermatitis. *Parasite Immunol* 2008;30(11-12):585-95.

LINCOT, D. Electrodeposition of semiconductors. **Thin Solid Films**, v. 487, n. 1-2, p. 40–48, 2005.

LINS, R.A.B. ET AL. A distribuição dos eosinófilos nas diferentes fases de evolução do granuloma hepático em camundongos infectados pelo *Schistosoma mansoni*. *Rev Soc Bras Med Trop* 2008 mar-abr;41(2):173-178.

LIU, A.; WANG, K.; WENG, S.; LEI, Y.; LIN, L.; CHEN, W.; LIN, X.; CHEN, Y. Development of electrochemical DNA biosensors. *Trends in Analytical Chemistry*, v.37,p. 101-111, 2012.

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.

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.

LUONG, J.H.; MALE, K.B.;GLENNON, J.D.;(2008). Biosensor technology: technology push versus Market pull. *Biotechnological Advances*. 26: 492-500.

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).

MA, T.; DI, J.; YAN, X.; ZHAO, M.; LU, Z.; TU, Y. Direct electrodeposition of gold nanoparticles on indium tin oxide surface and its application. *Biosensors and Bioelectronics*, v.24, p.1480-1483, 2010.

MACDONALD, R.J. AND JOHNSON, W.B. (2005) *Fundamental of Impedance Spectroscopy*. In: Barsoukov, E. and Macdonald, R.J., Eds., *Impedance Spectroscopy: Theory, Experiment, and Applications*, 2nd Edition, John Wiley & Sons, Inc., New Jersey.

MAHADHY A. **Ph.D. Thesis**. Lund University; Lund, Sweden: 2015. Development of an Ultrasensitive Capacitive DNA-Sensor: A Promising Tool towards Microbial Diagnostics.

MAHADHY A., STÅHL-WERNERSSON E., MATTIASSON B., HEDSTRÖM M. Use of a capacitive affinity biosensor for sensitive and selective detection and quantification of DNA—A model study. **Biotechnol. Rep.** 2014;3:42–48. doi: 10.1016/j.btre.2014.06.002.

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>.

MARTINS-JUNIOR, R.R. Eletroquímica acoplada à ressonância de plásmons de superfície no estudo de adsorção de proteína em filme fino. **Dissertação de mestrado**, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil, 2017.

.MELO, A. L.; COELHO, P. M. Z. *Schistosoma mansoni* e a doença. In: neves, D.P; melo, A.L; linardi, P.M; vitor, R.W.A. *Parasitologia humana*. 11ª ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2005. Cap 22, p.193-212.

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.

MELO, A. L.; COELHO, P. M. Z. *Schistosoma mansoni* e a doença. In: NEVES, D. P. et al. *Parasitologia humana*, 15. ed. São Paulo: Atheneu, 2016.

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

MELO, L. D; KUBOTA, L.T. Biosensor as a tool for the antioxidant status evaluation. **Talanta** 72(2):335-48, 2007

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.

MENGUI, U.A. **Crescimento por BEM e caracterização de filmes SnTe e heteroestruturas de SnTe/Sn_{1-x}EuxTe sobre BaF₂**. 117f. 2006.Dissertação (Mestrado em

Engenharia e Tecnologia Espaciais) Instituto nacional de pesquisas espaciais, São jose dos campos, 2006.

MEYER, E.; Atomic force microscopy. Prog. in Surf. Sci. v.41, p.3-49, (1992)

MIESZAWSKA, A.J.; MULDER, W.J.M.; FAYAD, Z.A.; CORMODE, D.P. Multifunctional Gold Nanoparticles for Diagnosis and Therapy of Disease, Mol. Pharm., 10 (2013) 831-847.

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

MILAN, E.P., KEIM, L.S. Esquistossomíase mansônica. In: Tavares W, Marinho LAC, (editores). Rotinas de diagnóstico e tratamento das doenças infecciosas e parasitárias. 2ª ed. São Paulo: Atheneu; 2007. p. 345-50.

MOHAN, S.; SRIVASTAVA, P.; MAHESHWARI, S. N.; SUNDAR, S.; PRAKASH, R. Nano-structured nickel oxide based DNA biosensor for detection of visceral leishmaniasis (Kala-azar). *Analyst*, 2011,**136**, 2845-2851

MOHANTY,S. P. and Kougianos, E. “Biosensors: a tutorial review,” IEEE Potentials, vol. 25, no. 2, pp. 35–40, Mar. 2006.

MORADI, M.; SATTARAHMADY, N.;RAHI, A.; HATAM, G.R.; REZAYATSORKHABADI, S.M.; HELI. H. A label-free, PCR-free and signal-on electrochemical DNA biosensor for *Leishmania major* based on gold nanoleaves. **Talanta**. V.1, p. 48-53. 2016

MOREL, C. M. et al. Co-authorship network analysis: A powerful tool for strategic planning of research, development and capacity building programs on neglected diseases. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 3(8):e501, 2009.

MORF, P.; RAIMONDI,F.; NOTHOFER, H. G.; SCHNYDER, B.; YASUDA, B.; WESSELS, J. M.; JUNG, T. A. Dithiocarbamates: Functional and Versatile Linkers for the Formation of Self-Assembled Monolayers. **Langmuir** 2006, 22, 658–663.

MURBACK, N.D.N.; HANS FILHO, G.; NASCIMENTO, R.A.F;NAKAZATO, K.R.O.; DORVAL, M.E.M.C. American cutaneous leishmaniasis: clinical, epidemiological and

laboratory studies conducted at a university teaching hospital in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. **An Bras Dermatol.** 2011;86(1):55-63.4.

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

NASCIMENTO, G.L.; OLIVEIRA, M.R. Severe forms of schistosomiasis mansoni: epidemiologic and economic impact in Brazil, 2010. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2014;108(1):2936. doi: 10.1093/trstmh/trt109

NASCIMENTO-CARVALHO, C.M, MORENO-CARVALHO, O.A. Neuroschistosomiasis due to *Schistosoma mansoni*: a review of pathogenesis, clinical syndromes and diagnostic approaches. *Rev. Inst. Med. Trop* 2005;47(4):179-184.

NASIRPOURI, F. Fundamentals and Principles of Electrode-Position. *Springer Series in Surface Sciences*, 75–121. doi:10.1007/978-3-319-44920-3_3(2016).

NAZARI-VANANI, R.; SATTARAHMADY, N.; YADEGARI, H.; DELSHADI, N.; HATAM, G.R.; HELI, H. **Electrochemical quantitation of *Leishmania infantum* based on detection of its kDNA genome and transduction of non-spherical gold nanoparticles.** *Anal Chim Acta.* 2018;1041:40-49.

NETO, S.Y.; SILVA, F.G.S.; SOUTO, D.E.P.; FARIA, A.R.; ANDRADE, H.M.; LUZ, R.C.S.; KUBOTA, L.T.; DAMOS, F.S. Photoelectrochemical immunodiagnosis of canine leishmaniasis using cadmium-sulfide-sensitized zinc oxide modified with synthetic peptides. *Electrochem. Commun.* 2017, 82, 75–79.

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.

NOBRE, V. et al. Schistosomal Myeloradiculopathy due to *Schistosoma mansoni*: Report on 23 Cases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 96, p. 137-141, 2001.

NUNES, K. M. T.; CARDOSO, A. E. C.; PEREIRA, F. S. G.; BATISTA, L. H. C.; HOULY, R. L. S. Esquistossomose cutânea ectópica - Relato de caso. *An. Bras. Dermatol.* vol.88 no.6 Rio de Janeiro Nov./Dec. 2013.

ODUNDO, J. NAUMIH, N.; ANDALA, D.; KIRAGU, J.; NDIKAU, M.; KIMANI, G. et al., Spectroelectrochemical Characterization Of Anti-Schistosoma-Gold Nanoparticle Conjugate For Use In Immunoassays, *Journal Kenya Chemical Society*, 9(2016)

OLIVEIRA, R.; PISSETTI, F. L.; LUCHO, A. M. S. Eletrodos de fto modificados por eletrodeposição direta de ouro: produção, caracterização e aplicação como sensor eletroquímico. *Quim. Nova*, Vol. 39, No. 2, 146-155, 2016.

OPAS- Organização Pan-Americana da Saúde: Leishmanioses: Informe Epidemiológico nas Américas: Washington: Organização Pan-Americana da Saúde; 2019 Disponível em: www.paho.org/leishmaniasis

ORAZEM, M. E.; TRIBOLLET, B. **Electrochemical Impedance Spectroscopy**, John Wiley & Sons, New York, 2008.

OTLES, S. (Ed.). (2016). *Handbook of food analysis instruments*. CRC Press.

OZSOZ, M.S. *Electrochemical DNA Biosensors*. 1 ed. New York: Jenny Stanford Publishing . 2012

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

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

PAN, S; ROTHBERG, L. Chemical control of electrode functionalization for detection of DNA hybridization by electrochemical impedance spectroscopy. **Langmuir**. 2005 Feb 1;21(3):1022-7.

PASA, A. A., MUNFORD, M. L., **Electrodeposition – Encyclopedia of Chemical Processing**. New York: Dekker Encyclopedias, 821-832 (2006).

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.

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

PEREGRINO, A.J.P. et al. Esquistossomose Medular: análises de 80 casos. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, São Paulo, v.60, n.3, 2002.

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

PERINOTO, A. C.; GIMENEZ, R.; SANTOS, M. R.; MIGLIACCIO, F.; PEREZ, V.; STABELI, K. G. et al. Biosensors for Efficient Diagnosis of Leishmaniasis: Innovations in Bioanalytics for a Neglected Disease. **Analytical Chemistry** 82(23):9763-8 · November 2010

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.; 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.

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.

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.

PRATA, A. Esquistossomose Mansonii. In: Veronesi R, Veronesi FR, (editor). Tratado de infectologia. 3ª ed. São Paulo: **Atheneu**; 2007. p. 1695-1720.

PRIVETT, B.J.; Shin, J.H. Schoenfisch MH. Electrochemical sensors. **Anal Chem**. 2010 Jun 15;82(12):4723–41

QIU, J. D.; PENG, H. P.; ANG, R. P. L.; XIA, X. H. Facile preparation of magnetic core-shell Fe₃O₄@Au nanoparticle/myoglobin biofilm for direct electrochemistry **Biosensors and Bioelectronics** 25, 1447 (2010).

QUINNEL, R. J.; COURTENAY, O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. **Parasitology**, Dec; 136 (14): 1915-34, 2009.

RABELLO, A., et al. Diagnóstico parasitológico, imunológico e molecular da Esquistossomose mansonii. In: CARVALHO, OS., COELHO, PMZ., and LENZI, HL., orgs. Schistosoma mansonii e esquistossomose: uma visão multidisciplinar [online]. Rio de Janeiro: Editora **FIOCRUZ**, 2008, pp. 895-925.

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.

RAHAIE, M.; KAZEMI, S. S. Lectin-based: As powerful tools in bioanalytical applications. **Biotechnology**. v. 9, n. 4, p. 428-443, 2010.

RAMOS-JESUS, J; PONTES-DE-CARVALHO, L.C; MELO, S. M.B; NEVES, N.M.A; DUTRA, R. A gold nanoparticle piezoelectric immunosensor using a recombinant antigen for detecting *Leishmania infantum* antibodies in canine serum. **Biochemical Engineering Journal**, 11015, 2016, 43-50

RANA, S.; BAJAJ, A.; MOUT, R.; ROTELLO, V.M. Monolayer Coated Gold Nanoparticles for Delivery Applications, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 64 (2012) 200-216.

REIMHUT,E.; GRIESHABER, D.; MACKEZIE, R.; VOROS, J. Electrochemical Biosensors-Sensor Principles and Architectures, **Sensors**, p.1400-1458, 2008.

REY, L. Bases da parasitologia Médica. 3ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2011

REESE, R.A; XU, B. Single-molecule detection of proteins and toxins in food using atomic force Microscopy. **Trends in Food Science & Technology** 87 (2019) 26–34

RODRIGUES, L. P. **Desenvolvimento e caracterização de filmes derivados de poli(acidos hidroxifenilacéticos) para aplicação abiodeteccção de Neisseria meningitidis e Anaplasma marginale**. 2014. 155 f. (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

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

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.

ROMÃO, P. R.T et al., Leishmaniose: resposta imune e mecanismos antioxidantes de escape. Criciúma: Revista de Pesquisa e Extensão em saúde, 2007. p. 1-10.

ROSÁRIO, E.Y.; GENARO,O.; FRANÇA-SILVA, J.C.; DA COSTA, R.T.; MAYRINK, W.; REIS A.B.; CARNEIRO, M. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude Leishmania and recombinant antigens as diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.100, 197-203,2005.

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

ROSE, M. F.; ZIMMERMAN, E. E.; HSU, L.; GOLBY, A. J.; ,SALEH, H.; FOLKERTH, R. D.; SANTAGATA, S. S.; MILNER JR, D. A.; RAMKISSOON, S. H. Atypical presentation of cerebral schistosomiasis four years after exposure to *Schistosoma mansoni*. **Epilepsy & Behavior Case Reports** 2. 80–85. 2014.

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.

RUMAYOR, V.G.; IGLESIAS, E.G.; GALÁN, O. R.CABEZAS, L. G. Aplicaciones de biosensores en la industria agroalimentaria. Fundación para el conocimiento madri+d. Informe de Vigilancia Tecnológica 119 p. 2005

SALEHIZADEH, H.; HEKMATIAN, E.; SADEGHIAND, K.; KENNEDY, M. Synthesis and characterization of core-shell Fe₃O₄-gold-chitosan nanostructure. **Journal of Nanobiotechnology** 10, 3 (2012).

SAHA, K.; AGASTI, S.S.; KIM, C.; LI, X.; ROTELLO, V.M. Gold Nanoparticles in Chemical and Biological Sensing, *Chem. Rev.*, 112 (2012) 2739-2779.

SANTOS, A.R. Esquistossomose. **Fundação Nacional da Saúde** – Gerência Técnica de Esquistossomose (2008). Disponível em – <http://www.funasa.gov.br/acoes/doencas/esquis/esquis.htm>.

SANTOS, E.C et al. Perfil clínico e critérios diagnósticos da mielorradiculopatia esquistossomótica. **Arquivos de Neuropsiquiatria** 2001; 59:772-777.

SANTOS, G.S; CALDAS, R.G.S.C; MELO, F.L; BRUSCKY, I.S; SILVA, M.A.L.; WANDERLEY, L.B; ANDRADE, C.A; OLIVEIRA, M.D.L. Label-free nanostructured biosensor for *Schistosoma mansoni* detection in complex biological fluids. **Talanta** 204 (2019) 395–401.

SANTOS, G.S; F.L; ANDRADE, C.A; BRUSCKY, I.S; WANDERLEY, L.B; OLIVEIRA, M.D.L. Impedimetric nanostructured genosensor for detection of schistosomiasis in cerebrospinal fluid and serum samples. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** 137 (2017) 163–169.

SARID, D.; Scanning Force Microscopy; With Application to Electric, Magnetic, and Atomic Forces (Oxford Series on Optical Sciences, Oxford University Press, Oxford, 1991).

SAKKAS, H.; GARTZONIKA, C.; LEVIDIOTOU, S. Laboratory diagnosis of human visceral leishmaniasis. **Journal of Vector Borne Diseases**, v. 53, n. 1, p. 8, 2016.

SERAPIÃO, M.; SERAPIÃO, C.; KISS, A.; APPEL, H. Diagnóstico intraoperatório de esquistossomose mansônica cerebelar pseudotumoral. **J. Bras Patol Med Lab.** v. 45, n. 1, p. 69-73, 2009.

SHERVEDANI, R.K.; MEHRJARDI, A.H.; Electrochemical characterization of directly immobilized glucose oxidase on gold mercaptosuccinic anhydride self-assembled monolayer. **Sensors and Actuators B**, 126:2, 415-423, 2007

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>

SHOHAYEB, M.; ARIDA, H.; MERSAL, G. A.M.; EL-BADAWY, M. **Development of a Nanotechnology-Based Screen-Printed Biosensor for Detection of Schistosoma Mansoni Antibodies.** *Int. J. Electrochem. Sci.*, 11 (2016) 1337 - 1344

SHU, H. ; CAO, L.; CHANG, G.; HE, H.; ZHANG, Y.; HE, Y., Direct electrodeposition of gold nanostructures onto glassy carbon electrodes for non-enzymatic detection of glucose. *Electrochemical Acta*, v.132, p.524-532, 2014.

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.

SILVA, L.C.S et al. Mielorradiculopatia esquistossomótica. Artigo de revisão. *RSBMT* 37(3):261-72, mai-jun, 2004.

SILVEIRA, F. T.; MÜLLER, S. R.; SOUZA, A. A. A.; LAINSON, R.; GOMES, C. M.C.; LAURENTI, M.D.; CORBETT, C. E.P. revisão sobre a patogenia da leishmaniose tegumentar americana na Amazônia, com ênfase à doença causada por *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (L.) amazonensis*. *Revista Paraense de Medicina* V.22 (1), 2008.

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

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

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.

SOUTO, D.E.P; SILVA, J.V; REIS, A.B; DAMOS, F.S. Development of a label-free immunosensor based on surface plasmon resonance technique for the detection of anti-Leishmania infantum antibodies in canine serum. **Biosensors and Bioelectronics**. 4615. 2013. 22-29

SOUZA, D.; MACHADO, S.A..S.; AVACA, L.A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: aspectos teóricos. *Química Nova*, v.26, n.1, p.81-89, 2003.

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

SOUZA, F. P. C.; VITORINO, R. R.; COSTA, A. P.; JUNIOR, F. C. F.; SANTANA, L. A.; GOMES, A. P. Esquistossomose mansônica: aspectos gerais, imunologia, patogênese e história natural. *Rev. Bras. Clin. Med.* v 9 (4), p 300-307, 2011.

STENGER, V., Rugosidade Superficial de Camadas Eletrodepositadas de Óxido de Cobre. Dissertação de mestrado, Curso de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Santa Catarina (2008).

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

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

STRADIOTTO N.R.; YAMANAKA H., ZAONI M.V.B. Eletrochemical sensors: a powerful tool in analytical chemistry. **J. Braz. Chem. Soc.**, vol. 14, n.2, p 159-73, 2003.

SUÁREZ, G., SANTOSCHI, 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.

SUN, Y.; HE, X.; JI, J.; JIA, M.; SUN, X. A highly selective and sensitive electrochemical CS–MWCNTs/Au-NPs composite DNA biosensor for *Staphylococcus aureus* gene sequence detection. **Talanta**. 14115, 2015, 300-306.

TÁVORA, M.P.F; PEREIRA, M.A.V; SILVA, V.L; VITA, G.F. Estudo de validação comparativo entre as técnicas Elisa e RIF para diagnosticar *Leishmania* sp em cães errantes apreendidos no município de Campos dos Goytacazes, Estado do Rio de Janeiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** . 40(4):482-483, 2007

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.

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

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.

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)

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.

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

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.

WANG. J. From DNA Biosensors to Gene Chips. **Nucleic Acids Research.** 2000. v.28, n.16, p.3011-3016.

WANG W, WANG L, LIANG YS. Susceptibility or resistance of praziquantel in human schistosomiasis: a review. *Parasitol Res*, v. 111: p. 1871–1877, 2012.

WANG, B., et al. Stem cell heterogeneity drives the parasitic life cycle of Schistosoma mansoni. *eLife Research Article*, Chicago-USA ,v.7, p. 1-23, jul. 2018

WANG, J. Analytical Electrochemistry. Third Edit ed. [s.l.] John Wiley & Sons, Inc., 2006

WEERAKOON, K. G. A. D.; GOBERT, G.N.; CAI, P.; MCMANUS, D. P. **Advances in the Diagnosis of Human Schistosomiasis.** *Clinical Microbiology Reviews*.v.28, n.4, p. 939-967, october 2015.

WICHMANN, D., PANNING, M., QUACK, T., KRAMME, S., BURCHARD, G.D., GREVELDING, C.,DROSTEN, C., 2009. Diagnosing schistosomiasis by detection of cell-free parasiteDNA in human plasma. **PLoS Negl. Trop. Dis.** 3, e422.

WILLNER, I.; WILLNER, B., Biomaterials integrated with electronic elements: en route to bioelectronics. **Trends in Biotech.** 19, 222-230, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Elimination of schistosomiasis in low transmission áreas: 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. 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Schistosomiasis. Disponível em: <<http://www.who.int/schistosomiasis/disease/en/>>. Acesso em: 18. jan. 2018.

WU, Z.Y; SHEN, G.L; LI, Z.Q; WANG, S.P; YU, R.Q. A direct immunoassay for schistosoma japonicum antibody (SjAb) in serum by piezoelectric body acoustic wave sensor. **Analytica Chimica Acta.** 398 (111), 1999, 57-63

WU, Z.; WU, J.; WHANG, S.; SHEN, G. An amplified mass piezoelectric immunosensor for Schistosoma japonicum. **Biosensors & Bioelectronics** 22(2):207-12 2006

XU, L.; DU, J.; DENG, Y.; HE, N. Fabrication of magnetic porous pseudo-carbon paste electrode electrochemical biosensor and its application in detection of schistosoma egg antigen, **Electrochemistry Communications**, 12(2010) 1329-32.

ZHANG, S.; WRIGHT, G. e YANG, Y. Materials and techniques for electrochemical biosensor desing and construction. **Biosensors and Bioelectronics**, v,15, p.273-282, 2000.

ZHANG, L.; GU, F. X.; CHAN, J. M.; WANG, A. Z.; LANGER, R. S.; FAROKHZAD, O. C.; Nanoparticles in medicine: therapeutic applications and developments. **Clin. Pharmacol. Ther.** 2008,83,761.

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.

ZHOU, Y.M., HU S.Q., CAO, Z.X., SHEN, G.L, YU, R.Q. Capacitive Immunosensor for the determination of Schistosoma japonicum antigen. **Anal. Lett.**, 35 (12) (2002), p. 1919

ZICKER, F.; CUERVO, L. G.; SALICRUP, L. A. Promoting high quality research into priority health needs in Latin America and Caribbean. **The BMJ**, v. 362, 16 jul. 2018.

ZICKER, F. Doenças tropicais negligenciadas: uma agenda inacabada / Fabio Zicker, Priscila Costa Albuquerque, Bruna de Paula Fonseca e Fonseca. – Rio de Janeiro: **Fundação Oswaldo Cruz**, 2019. 45 p.

APÊNDICE A — BIOSENSORS A NEW LOOK FOR THE DIAGNOSIS OF SCHISTOSOMIASIS – A MINI-REVIEW

Review Article em preparação para submissão no periódico Biosensor Fator de impacto: 3.57;

Qualis: B2



BIOSENSORS A NEW LOOK FOR THE DIAGNOSIS OF SCHISTOSOMIASIS – A MINI-REVIEW

Giselle, S. Santos ^{a,b}, Fábio, L. Melo^c, Cesar A.S. Andrade^b, Maria D.L. Oliveira^{a,b}

^aPrograma de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil

^bDepartamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil

. Departamento de Parasitologia, Instituto Aggeu Magalhaes /FIOCRUZ, 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 tropical disease present worldwide. It is a debilitating disease that can lead the patient to death when not diagnosed early. Rapid and reliable

diagnosis is essential for disease control and monitoring. Current diagnostic tests have limitations that need to be overcome and the development of new diagnostic alternatives for this pathology is of fundamental importance, and biosensors are promising tools for this purpose. Biosensors are devices based on the interaction of a biological component with a detector component. Biosensors have very high selectivity and sensitivity, making them very attractive for many applications in different areas of the biomedical sciences. This review addresses the potential of biosensors for schistosoma detection. Emphasis is given to the approaches that were used to construct biosensors, electrochemical, piezoelectric and optical. In addition, an overview of biosensor fundamentals, transducer technology and usage will be described. This review provides a summary of recent progress and advances in Schistosoma detection-related biosensor technology.

Keywords: Schistosomiasis; Biosensors, Diagnosis.

1. Introduction

Schistosomiasis, a debilitating neglected tropical disease caused by *Schistosoma* helminths, is considered one of the most serious parasitic infections in the world [1, 2]. Five species of schistosoma can parasitize humans: *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma mekongi* and *Schistosoma intercalatum*, the first three being the most common[3]. In Brazil the only species found is *Schistosoma mansoni*, which usually colonizes the human portal system. Currently about 25 million people live in endemic areas in Brazil and 4 to 6 million are infected, most of them located in the Northeast states[4]. The outbreaks of contamination occur predominantly in rural areas, and in poor communities on the outskirts of large cities, where basic sanitation is lacking and waste is discharged directly into streams that feed rivers and lakes, making them an environment conducive to the proliferation of snails, intermediate hosts, fundamental element for their biological cycle (Fig.1)[5].

Despite the efforts and relative progress made in treating schistosomiasis, the disease remains widespread, affecting some 207 million people, causing 280 thousand deaths annually and is present in about 78 countries [7, 8]. The large number of individuals affected by this disease may be related to its problematic diagnosis [9]. More recent statistical data show little change from previously reported data, indicating that schistosomiasis has not yet been effectively controlled [10]. This disease is considered one of the major infectious tropical diseases, which has significant public health implications and significant socioeconomic impacts in the developing world [11-14]. The close relationship with poverty, geographic isolation, stigmatization, and lack of political interest as well as a global funding structure established to combat the disease are some of the factors that explain the general abandonment of schistosomiasis and other neglected tropical diseases [15-17].

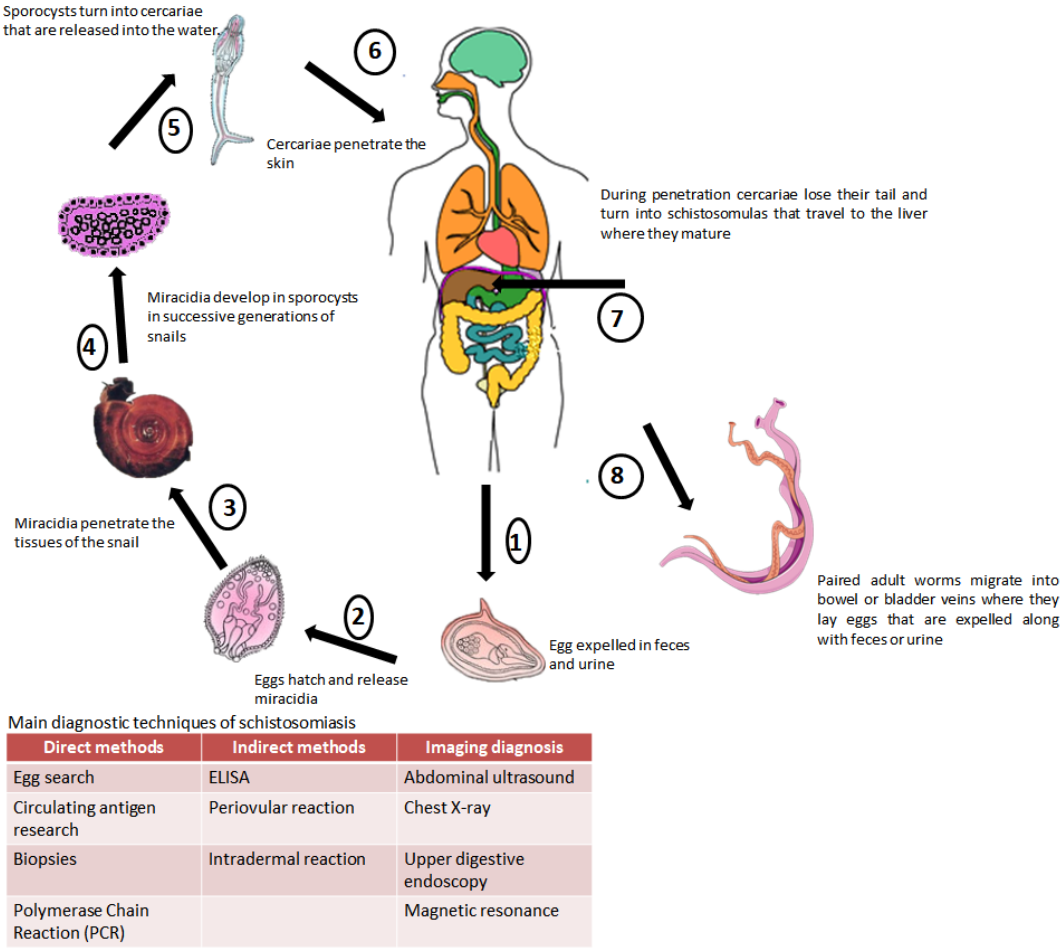


Figure 1: Biological cycle of *Schistosoma mansoni*. **insert:** main diagnostic techniques of schistosomiasis. Source: [6] adapted.

Because these worms are intravascularly located, the validation of the sensitivity of schistosomiasis diagnostic techniques is difficult [9]. For its diagnosis, fecal and urine samples are often analyzed for eggs [18]. However, this technique has limited sensitivity when performed in individuals with low worm burden and in areas of low endemicity [9]. Bladder or rectal mucosa biopsy is a diagnostic alternative when individuals have characteristic symptoms of schistosomiasis, but without positive urine and feces analysis, but it is a very invasive technique [18, 19].

Serology is also a widely used technique for the diagnosis of schistosomiasis, and is a sensitive tool especially for low-intensity infections [11, 20-22]. ELISA detection of

antibodies is very efficient in mild infections and may also be used on a large scale [9], however, it is not as efficient in distinguishing past from current infections [23].

Alternatively, research over the past two decades has paid close attention to understanding the molecular foundations of various stages of *Schistosoma* development in an effort to achieve more efficient, long-term and sustainable control of schistosomiasis [24]. These efforts are justified because low levels of infection may not be clinically important; however, in the context of disease elimination the development of sensitive diagnostic tools capable of detecting a single pair of worms is essential [9]. For this reason, the World Health Organization has signaled the need for sensitive and specific diagnostic tools for the complete elimination of the disease, especially in low transmission environments [25]. Hence, it is necessary to develop and implement more effective methodologies for the diagnosis of schistosomiasis, which have high sensitivity, as well as the absolute specificity that will be required in control and elimination programs of this disease [26]. Thus, biosensors are promising tools to achieve this goal.

Biosensors are important tools to complement existing diagnostic techniques, thanks to their unique features such as selectivity, relative low cost of development and storage, potential for miniaturization, ease of automation as well as the ability to build simple and portable devices [27]. Such devices combine a biological component, which interacts with a target substrate, with a physical transducer, which converts biorecognition processes into measurable signals [28].

One of the great advantages of biosensors is the possibility of their use in the place of care. Point-of-care testing involves rapid diagnostic tests performed at the patient care site for immediate results [29]. Thus point-of-care sensors and biosensors have significant applications as diagnostic tools [30]. In this review, we will address some recent aspects and advances in the development of biosensors for the diagnosis and detection of Schistosome.

2. Biosensors Definition

Biosensors are devices that integrate a biological component with a detector component. Have three fundamental components: A biological material; a transducer or detector element that is responsible for converting the biochemical signal from the recognition element into a readable and quantified signal and a signal processor displaying the transformed signal [31, 32]. The most commonly used biorecognition elements are: enzymes, antibodies, oligonucleotide probes, aptamers, cell surface molecules [33-35] and of all biosensors developed, the most commonly used are electrochemical [36-38], optical [39, 40] and piezoelectric [41-43], as can be seen in figure2.

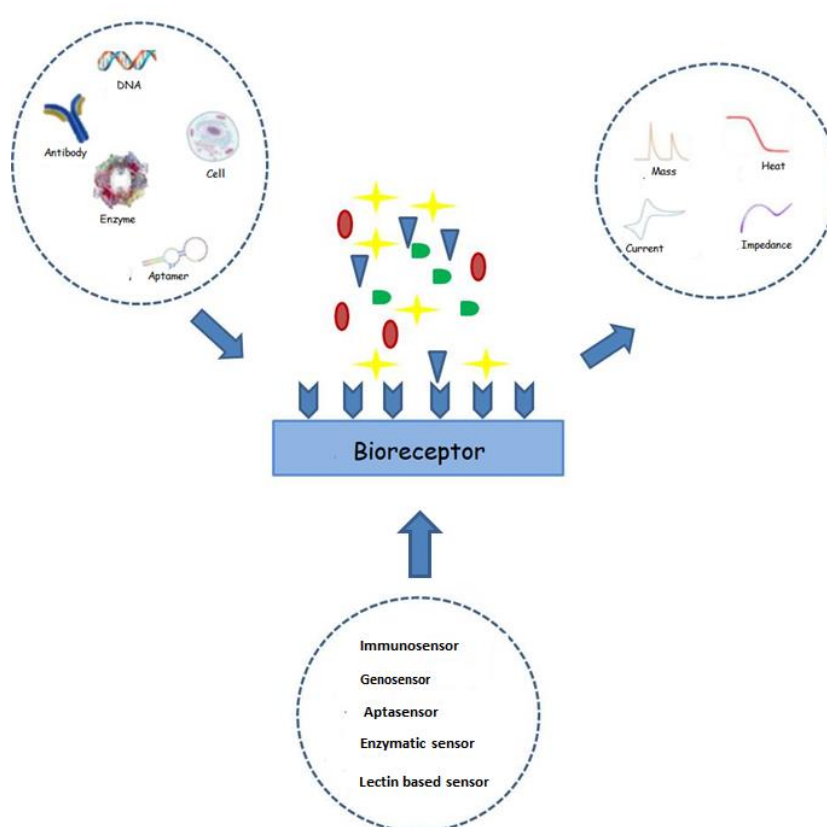


Figure 2: Schematic representation of a biosensor. Source: [44] Adapted

Biosensors are devices capable of rapidly detecting both chemical and / or biological substances, both qualitatively and quantitatively. In general, the application of a biosensor enables quantitative and qualitative identification, since this device responds selectively and

reversibly, producing an electrical signal whose intensity depends on the concentration of the sample [45].

There are different ways of classification for biosensors, following the suggestions of the IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry,) we can classify them based on the specificity of the biological material used for the recognition or by the transduction mode of the generated signal or by combining them. [46]. With respect to biological material can be classified as: biocatalytic [47, 48] (enzymes, cells or tissues) or by bioaffinity [49-51] (antigens, antibodies or DNA fragments).

Regarding the type of transducer, biosensors can be classified as electrochemical based on movement of ions and diffusion of electroactive species, optical where temperature change is taken into account, piezoelectric with mass change and / or microviscosity as the basis for analysis and analysis. Where the absorption or emission of electromagnetic radiation is the main data to be analyzed [52]. Among these types of transducers, electrochemicals have stood out.

3. Electrochemical Detection Strategies

In recent times, great attention has been paid to the development of electrochemical biosensors, due to their reduced cost, portability, simplicity of handling, because they offer more sensitive detection via signal amplification and are compatible with mass production with the help of microfabrication technologies [32]. The electrochemical sensors analyze the response obtained in the form of an electrical signal, due to chemical reactions involving ions or electrons, these reactions cause changes in the electrical properties of the solution or electrode surface (Figure 3). These changes are used as a detection parameter and can be classified into: Amperometric, Potentiometric and Conductivity [53].

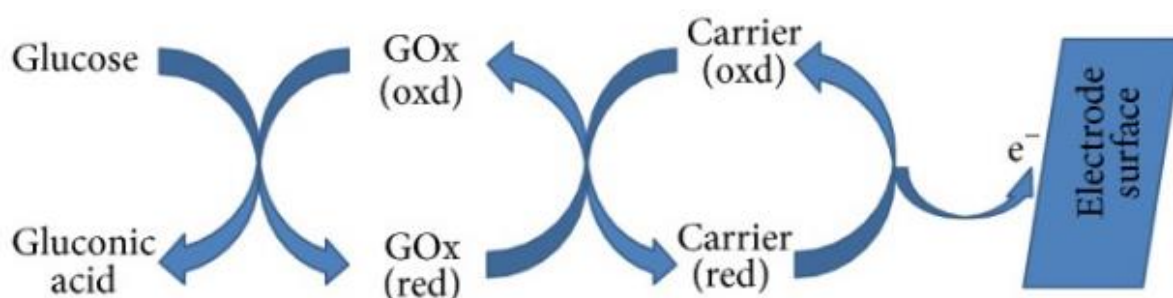


Figure 3: Schematic representation of an enzyme-modified electrochemical biosensor. Source: [43].

According to IUPAC amperometric detection is defined as a detection method where the generated current is proportional to the concentration of the current generating species. This type of detection is based on the measurement of current resulting from the electrochemical oxidation or reduction process of an electroactive species. It is usually obtained by maintaining a constant potential on a working electrode or series of electrodes relative to a reference electrode, which can also serve as an auxiliary electrode if currents are low. The resulting current is directly proportional to the concentration of the electroactive species or its rate of production or consumption [54]. In the amperometric detection methods a potential difference is applied to the working electrode, thus achieving that the species to be determined reacts and thus a current is generated. Usually the fundamental measurement system consists of three electrodes. A working electrode where the reaction to be analyzed will occur, a reference electrode that adjusts the potential applied to the working electrode, and a counter electrode that supplies the current also to the working electrode.

Potentiometric biosensors are related to the detection of an ion concentration gradient by means of an electrode. These devices use ion-selective electrodes as a means of transducing the biological reaction in an electrical signal. In this type of biosensor, H^+ proton generation alters the pH of the medium and a potential difference is created between the reference electrode and the ion-selective electrode [55]. Potentiometric biosensors can determine the electric potential difference between a working and reference electrode in an electrochemical cell without any significant current flowing in the medium. The reference electrode potential remains invariable during measurement, while the working electrode

undergoes significant changes in potential after changes in analyte concentration [56]. Potentiometric biodevices assist in determining the activity of ions in an electrochemical reaction. Potentiometric sensors are good for measuring low analyte concentrations in small sample volumes [57].

A conductivity biosensor measures electrical conductance / resistance through its signal change. Their disadvantage is the difficulty of conductivity measurements with simple devices, of high sensitivity to temperature variations (are sensitive to variations in the order of $\pm 1^\circ\text{C}$) and because they require previous sample dilution. These bio-devices are related to the use of enzymes that produce or consume ionic species in the reactions catalyzed by them, changing the overall conductivity of the solution. In these devices, conductive polymers are used as transducers [58].

Among the different strategies that have been used to monitor such changes are: cyclic voltammetry and impedance spectroscopy.

3.1 Cyclic voltammetry

Voltammetry is the most commonly used electrochemical technique under dynamic conditions. Voltametric biosensors detect an analyte determining the current change as a function of applied potential. It is therefore an amperometric technique. Since there are several ways to vary a potential, there are also many forms of voltammetry, such as: polarography, linear scan, differential ladder, normal pulse, reverse pulse, differential pulse among others [59]. Generally, voltammetry is based on the voltage-current-time relationship in an electrochemical arrangement composed of three electrodes: working, auxiliary and reference electrodes [60-62].

In cyclic voltammetry, the voltage is measured between the reference electrode and the working electrode, while the current is measured between the working electrode and the counter electrode. The measurements obtained are plotted as current versus voltage, also known as voltammogram [59]. In cyclic voltammetry, the potential of a value at which no

reduction occurs is applied, as the potential for more negative regions (cathodic) increases the compound in solution, generating a current peak proportional to the concentration of this compound, when If the potential has already reached a value at which no reduction reaction occurs, the potential is swept in the opposite direction to the initial value, and in the case of a reversible reaction, products that have been generated in the right direction (and are still located electrode surface) will be oxidized, generating a symmetrical peak to the reduction peak [63].

The voltammogram shape for a given compound not only depends on the scanning rate and electrode surface, which is different after each adsorption step, but may also depend on the concentration of the analyte.

3.2 Electrochemical Impedance Spectroscopy

The Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS) technique provides a complete and detailed view of the electrical characteristics of the electrode / solution interface [64]. Impedance can be understood as the opposing force to the electric current in a circuit and is measured in the same units as resistance (Ω) [65]. However, resistance differs from impedance because resistance obeys Ohm's law [66].

In biological applications, a compound is commonly constructed on the electrode surface that will attract the target analyte thereby affecting the conductivity of the system through a blockage. When this strategy is used, measurements are commonly performed on a redox probe such as potassium ferricyanide [67]. Then, when the load is applied at a set frequency, a current flows through the electrochemical cell that is recorded by the potentiostat and converted by software to an impedance value with real and imaginary components [66]. In adsorption of the target molecule to the electrode, the impedance undergoes a detectable change, which has been demonstrated for a variety of chemical systems [68].

Impedance data can be presented in different ways, the most common being the nyquist diagram, where real and imaginary impedance components are plotted against each

other. Nyquist provides us with information about solution resistance, charge transfer resistance, and Warburg impedance. Bode Chart and Phase Angle are other ways of presenting impedimetric data [66].

EIS allows the analysis of any intrinsic property of the material or specific processes that may influence the conductivity, resistivity or capacity of an electrochemical system. Therefore, EIS is a useful tool in the development and analysis of materials for biosensor transduction. For electrochemical detection, impedance techniques are useful for monitoring changes in electrical properties resulting from biorecognition events on modified electrode surfaces. For example, changes in electrode conductance can be measured as a result of protein immobilization and antibody-antigen reactions on the electrode surface [59, 69, 70].

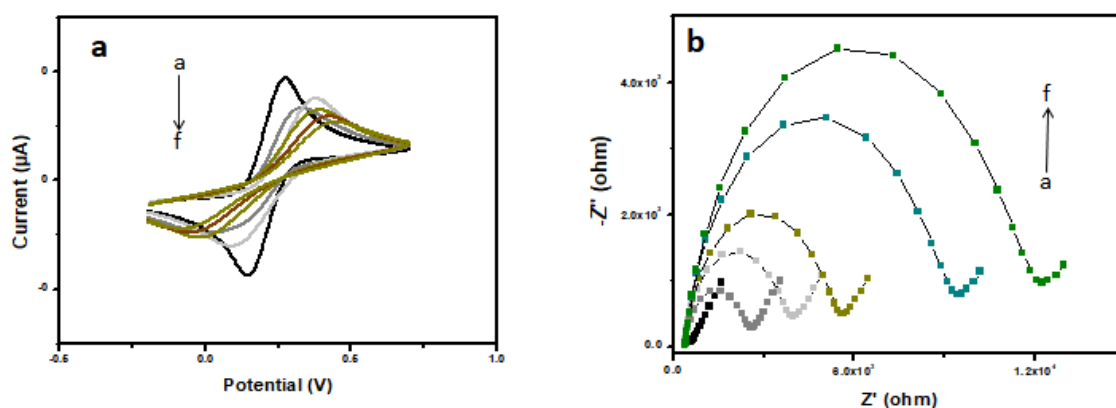


Figure 4: Examples for a measurement curve of cyclic voltammetry (CV) (a) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS) (b). The adsorption of molecules to the surface can be seen from a decrease in current (CV) and an increase in impedance (EIS).

4. Optical detection strategies

This type of detection is based on the analysis of changes in the optical properties of a solution to monitor the concentration of a given analyte. Optical biosensors are based on the measurement of light observed or emitted as a result of biological and/or chemical reaction

[71]. In these biosensors, optical fibers are used to conduct light waves to appropriate detectors such as an electrode or semiconductor [72]. They are very sensitive, however, they cannot be used in turbid media [73]. They have the following advantages: small size, high response speed, no electromagnetic noise interference, good biocompatibility and no active elements in the bioclayer [72].

Among the existing optical biosensors, there are those based on the surface plasmon resonance principle, SPR (Surface Plasmon Resonance). They stand out in the investigation of biomolecular interactions due, in addition to the aforementioned characteristics, to the high selectivity and sensitivity and analysis response time of the sample within minutes [10]. The operating principle of a typical SPR instrument is presented in Figure 5.

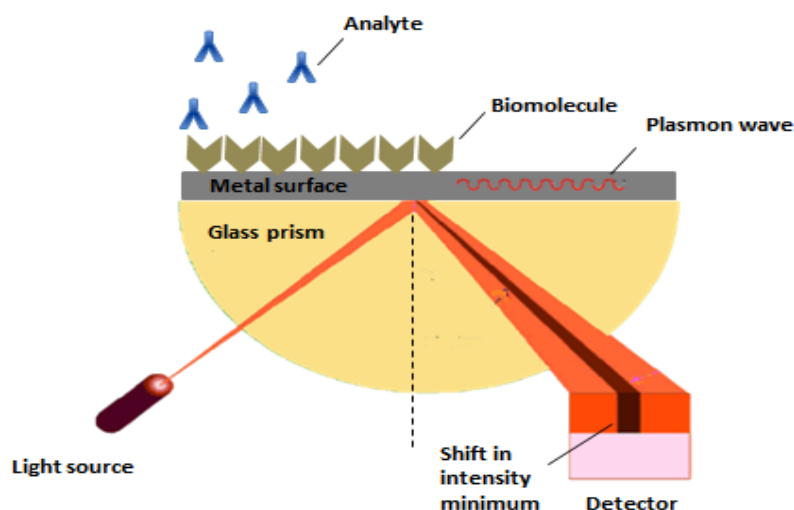


Figure 5: Surface Resonance Plasma (SPR). Source:[74] adapted.

5. Piezoelectric Detection Strategies

The most studied and used device for mass detection by this method is Quartz Crystal Microbalances (QCM), designation given to piezoelectric micro scales of Quartz crystals.

These types of biosensors contain in their transducers piezoelectric crystals with immobilized species. Then the vibration of these crystals when subjected to an electric field is analyzed. The frequency of this vibration varies according to the thickness and cut of the crystal, and each crystal has a characteristic vibration frequency. This characteristic frequency changes when the crystal absorbs or adsorbs molecules on its surface. As the frequency variation is proportional to the mass variation of the adsorbed material, such variation can be determined by electronic circuits [75]. The figure 6 shows the principle of operation of a piezoelectric immunosensor.

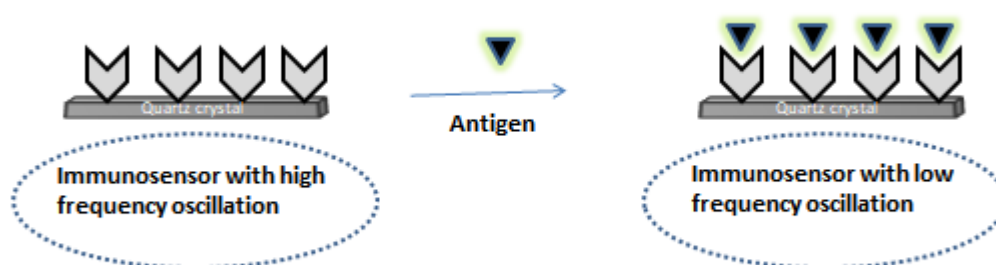


Figure 6: Principle of operation of a piezoelectric immunosensor. Source: [76] adapted.

The resonant frequency of an oscillating piezoelectric crystal is generally influenced by changes in mass on its surface. For example, when this surface is coated with an antigen, their binding to their specific antibodies causes the consequent increase in mass that can be detected by a change in frequency. Piezoelectric immunoassay techniques have been widely applied in clinical laboratories [33].

6. Nanostructured sensors for *Schistosoma* biodetection

Pathogenic detection techniques require speed and high sensitivity, because even at low concentrations in the body, pathogens can cause severe infections. To meet this demand, the

development of biosensors has been increasing, as they are tools that offer a fast, selective and portable way to detect these organisms [56].

In recent years, different sensors and biosensors have been developed for the detection of *Schistosoma*; Different detection strategies were used, including optical or electrochemical methods. Here, we mainly discuss sensors and biosensors based on various nanomaterials for *Schistosoma* detection.

The electrochemical recognition of *Schistosoma* has gained prominence in recent years. Increased sensitivity, small sample volume, low cost, simplicity and portability make electrochemical detection an excellent candidate for diagnosis of schistosomiasis. Although DNA detection is already an established method for the diagnosis of schistosomiasis with a growing number of publications annually, most reports of biosensor development for this condition focus on the area of immunosensors.

6.1 *Schistosoma* immunosensors

Traditional immunoassays can be defined as biochemical tests to quantify a substance based on its ability to bind to an antibody (immunoreaction), however, require expensive instrumentation, sample pretreatment, laborious work and strict operational procedures. In addition, they are time consuming and detection is indirect [77]. However, immunosensors can provide screening results, they are small, semi-automated and increasingly portable, therefore being the most advantageous immunosensors when compared to traditional analytical techniques [30, 78].

Immunosensors are analytical devices used to detect the process of antibody-antigen interaction with the formation of an stable complex [78]. Antibodies or Antigens can be immobilized on the surface of different transducers, thus producing a potential new immunosensor [79]. Immunosensors combine the advantages of good sensitivity and high selectivity. In addition, they allow immunoreaction processes on detector surfaces to be analyzed in real time. There are many reviews that address the development and application of

immunosensors associated with different detection methods, highlighting the main advantages of their construction methods [79-83].

For this reason, in order to develop new rapid and sensitive diagnostic methodologies for the detection of etiological agents of schistosomiasis, among them *Schistosoma japonicum*, a simple, sensitive and reusable piezoelectric immunosensor using a self-assembled monolayer membrane contained mixed technology (mixed SAM), was developed by Wang et al. a mixture of mercaptopropionic acid (MPA) and mercaptoethanol (ME) on the surface of quartz crystals by sulfur and gold bonds for detection of *S. japonicum* antigens directly from serum as an alternative for conventional diagnostic methods. Several rabbit serum samples infected with different concentrations of *S. japonicum* antibodies were analyzed using immunosensor and ELISA techniques and then a correlation analysis was performed. Correlation coefficients reached 0.973 [84]. Thus demonstrating the efficiency of the elaborate device.

Early diagnosis of this condition is important because long-term infections can result in serious injury that can cause blood flow blockage and portal hypertension, which can redirect eggs to the lungs and brain where they can be deadly [85]. An efficient strategy for early diagnosis of *S. japonicum* seems to be the direct detection of antigens. In this sense, cheng and collaborators [86] sought to develop a new diagnostic method based on a piezoelectric biosensor for direct detection of circulating *S. japonicum* antigens (SjCAG) in serum samples. For this, immunoglobulin G (IgG) and IgM antibodies were purified from the immunized rabbit serum. The study showed that QCM with polyclonal probes and direct serum dilution is a new and sensitive concept in the early phase of infection. The method was sensitive to about 500 cercariae, confirming that this method has the potential to detect *S. japonicum* in the early stage of infection.

With regard to new diagnostic methodologies, electrochemical immunosensors have been of great interest because it is an appropriate method for clinical diagnosis and can be used for situations where real-time monitoring capacity is required [87]. Thus, the study by Bojorge et al. [88] presents the development of an amperometric immunosensor based on a

rigid electrode array constructed from graphite and epoxy resin in which Apirasa is covalently immobilized for the determination of S. anti-antibody. Mansoni. Immobilization was monitored by cyclic voltammometry which showed a quasi-reversible and stable response over time. This process was also characterized by contact angles and scanning electron microscopy. These qualities are useful for the clinical determination of schistosomiasis, given the speed and sensitivity of the response.

Deng et al. [89] developed an electrochemical immunosensor for rapid detection of *Schistosoma japonicum* antigens, for which the antigen was immobilized on a 16-channel matrix printed carbon device. A portable electrochemical detector for antigen detection in serum samples. The results were promising showing that the developed sensor can be used on a large scale. A schematic representation of this process is shown in figure 7.

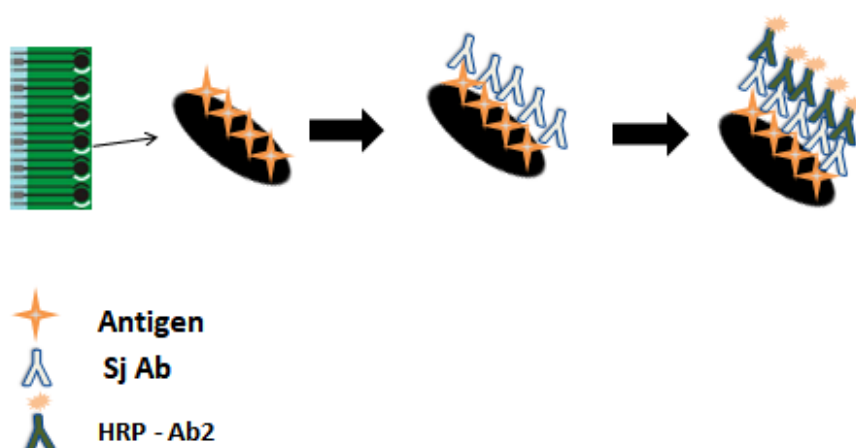


Figure 7: Schematic diagrams of a 16-channel disposable portable SjAb detection system. Source: [89] adapted

Many studies on the development of sensors for immune detection of schistosomiasis are found in the literature [90-96] Thus proving that immunosensors are effective for the diagnosis of schistosomiasis.

6.2 Genosensors for *Schistosoma*

Specific detection of nucleic acids has become increasingly relevant in the field of biomedical sciences, whether in discovering genetic diseases, diagnosing pathogen infections or even monitoring disease treatment. Nanotechnological progress and use of nanomaterials, have enabled the development of nanotechnology-based bioassays that are important and promising approaches that provide ultra-high sensitivity and specificity in nucleic acid detection [97].

An important feature of *S. mansoni* infections is the daily laying of about 300 eggs per female in the tissues. These eggs release parasite DNA into the tissues that reaches the bloodstream and urine and serve as the basis for diagnosis [98]. Techniques for using nucleic acid parasite free DNA detection in different samples as stools, blood, urine and tissues of the host configures a perspective significant increase in diagnostic sensitivity and specificity for infection by helminths. Technological advances and more widely available genomic data led several groups to explore such approaches to a variety of infections in definitive and intermediate hosts [99, 100]. Different nucleic acid detection methods have been developed, allowing accurate detection using multiple samples: snail infectious tissue [101-103], cercariae in contaminated water [104, 105] and excretion and blood samples from humans [106-108] and animals [109, 110]. In addition, nucleic acid-based detection has been shown to be superior in identifying schistosomes in cases of mild infections. The positivity rate is substantially higher than when using the Kato-Katz method and the outbreak of miracidia. Deoxyribonucleic acid (DNA) based assays noticeably reduce the rate of false negatives and effectively monitor potential exposure to schistosomiasis [98].

Even with so many advantages in identifying DNA for the diagnosis of schistosomiasis, there are few reports of genosensors developed to detect this pathology. However, Santos and collaborators developed a impedimetric biosensor for detecting *Schistosoma mansoni* DNA in different biological fluids. The developed sensor was based on self assembled layers of 3-mercaptopropyltrimethoxysilane (MPTS) and electrosynthesized gold nanoparticles (AuNPs) and the techniques of cyclic voltammetry and electrochemical impedance were used for their characterization. The biosystem was efficient in detecting *S. mansoni* genomic sequence at different concentrations in urine, cerebrospinal fluid and serum

samples with a detection limit of 0,6 pg μL^{-1} . [111]. Demonstrating the effectiveness of biosensors as promising tools for electrochemical detection of *Schistosoma* DNA.

The shortcomings that are characteristic of traditional DNA / RNA detection methods can be overcome by the use of nanomaterials due to their unique chemical and physical properties such as signal amplification and increased surface area. Moreover, nanomaterials provide endless options arrangements of various materials or combination of molecules, size, shape and different dimensions [112, 113]. Advances in nanotechnology include the use of noble metal nanoparticles [114], magnetic nanoparticles [115], quantum dots (QDs) [116], two-dimensional (2D) nanomaterials [117] among others. These technological advances were instrumental in the development of biosensors with high DNA / RNA detection capabilities, thus providing a promising research tool for ultra-sensitive DNA / RNA detection [97].

The use of nanomaterials in medicine means that traditional instrumentation and analysis methodologies are improved with each new discovery. Therefore, the use of nanoparticle-based diagnostic techniques offers high sensitivity [118]. In this perspective, the use of a nanocomposite composed of gold nanoparticles (AuNPs) and magnetite nanoparticles (Fe_3O_4 NPs) was the strategy used in the development of a sensing platform for *S. mansoni* detection. The proposed biosystem was able to recognize the *S. mansoni* specific nucleotide sequence present in cerebrospinal fluid (CSF) and serum samples at different concentrations of genome DNA. The platform showed a DNA detection limit of 0,781 and 0,685 pg L^{-1} for serum and CFS respectively. Thus, the biosensor obtained can be considered a useful tool for specific detection of *S. mansoni* at low concentrations regardless of the sample type [119].

Importantly, immobilization of the ss-DNA or analog DNA probe on the electrode surface is the first principle of an electrochemical DNA biosensor. Thus, hybridization of the DNA probe to the target DNA leads to a change in the electrochemical signal of the probe-bound electromagnetic markers or indicators [120, 121]. The signal generated is directly proportional to the amount of targets and the level of hybridization [32]. Figure 2 shows the schematic representation of schistosomal DNA detection using the so-called layer-by-layer format and its generated signal being detected by cyclic voltammetry.

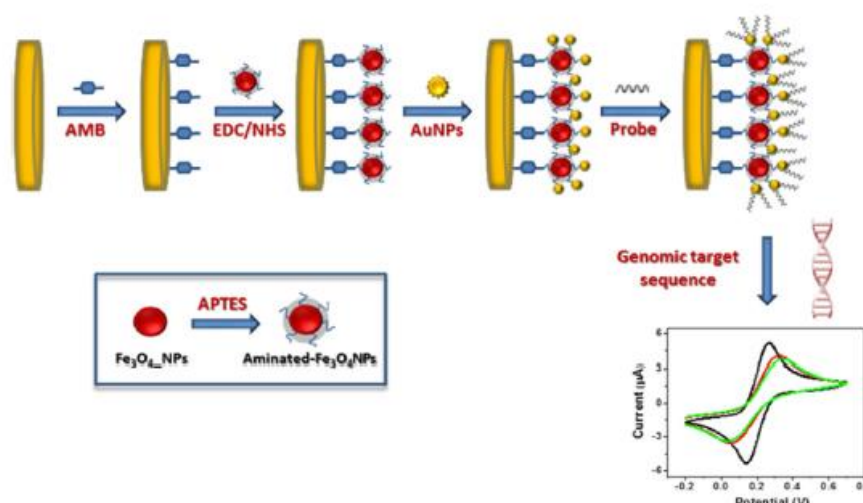


Figure 5: Schematic representation of a biosensor for *Schistosoma* DNA detection. Source: [119].

6.3 Other *Schistosoma* Biosensors

A synthetic biology approach methodology to systematically design, construct and characterize a schistosome biosensor capable of detecting the parasite in situ or in laboratories near watercourses has been developed by Web and collaborators. To this end, they have developed a modular microbial cell-based biosensor, as these systems can be produced relatively cheaply, can be stored in lyophilized forms and can be transported without cold storage. These systems are also self-replicating and therefore provide a sustainable supply of biosensors in resource-constrained environments. In addition, through synthetic biology, non-pathogenic bacteria and yeast have been successfully engineered from modular parts to create new biosensors that can detect a variety of substrates at very low concentrations and with high specificity [122].

A list of recent biosensors developed for the detection of different schistosome species is shown below:

Detection strategy	Schistosome species	Detect technique	Biosensor type	Limit	Reference
--------------------	---------------------	------------------	----------------	-------	-----------

Piezoelectric	<i>S. japonicum</i>	quartz crystal	Immunosensor	5 ng.mL ⁻¹	[90]
Electrochemical	<i>S. mansoni</i>	cyclic and differential pulse voltammetry	Immunosensor	0.038 ng.mL ⁻¹	[123]
Electrochemical	<i>Schistosoma</i> sp	anodic stripping voltammetry (ASV)	Immunosensor	0.01 µg.mL ⁻¹	[124]
Electrochemical	<i>S. japonicum</i>	stripping voltammetry	Immunosensor	1.3 ng.mL ⁻¹	[125]
Electrochemical	<i>Schistosoma</i> sp.	UV/Vis spectrometry and cyclic voltammetry	Immunosensor	3.31×10 ⁻⁵ ng.mL ⁻¹	[126]
Electrochemical	<i>S. japonicum</i>	linear sweep voltammetry (LSV)	Immunosensor	1:6457	[127]
Electrochemical	<i>S. mansoni</i>	Cyclic voltammetry and Impezeance spectroscopy electrochemical	Genosensor	0.781) pg _L ⁻¹ (Serum) 0.685 pg_L ⁻¹ (CFS)	[119]
Electrochemical	<i>S. mansoni</i>	Cyclic voltammetry and Impedance spectroscopy electrochemical	Genosensor	6.0 pg.µL ⁻¹	[111]

7. Conclusion

Nanoelectrochemical biosensors have taken scientific research in a new direction with improved analytical characteristics. Techniques, ranging from electrochemical, optical and piezoelectric, are modern transduction methods, widely used in the development of biosensors. Different types of nanomaterials have been integrated into biosensor designs for detection of different *Schistosoma* species. This review article reported recent advances in the construction of biosensors for schistosoma detection, reporting, alternative immobilization methodologies for nanolayers formation in the construction of electrochemical biosensors. Thus, the development of accurate and sensitive biosensors is of immense importance for the

field of biomedical sciences. Therefore, it is concluded that the fusion of nanotechnology with biosensor systems can improve the diagnostic capacity of this pathology.

Acknowledgements

G.S. Santos would like to thank CAPES for a Phd scholarship. Oliveira and Andrade would like to thank CNPq (grant 302885/2015-3 and 302930/2015-9).

8. References

- [1] R.E. Ewaisha, M. Bahey-El-Din, S.F. Mossallam, E.I. Amer, H.M. Aboushleib, 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.
- [2] M.L. Nelwan, *Schistosomiasis: Life Cycle, Diagnosis, and Control*, Current therapeutic research, clinical and experimental 91 (2019) 5-9.
- [3] B. Gryseels, K. Polman, J. Clerinx, L. Kestens, Human schistosomiasis, *The Lancet* 368(9541) (2006) 1106-1118.
- [4] J.R. Lambertuci, Acute Schistosomiasis mansoni: revisited and reconsidered, *Mem. Inst Oswaldo Cruz* 4 (2010) 422-435.
- [5] R.R. Vitorino, F.P.C. Souza, A.P. Costa, F.C. Faria, L.S. Junior, A.P. Gomes, Schistosomiasis mansoni: diagnosis, treatment, epidemiology, prophylaxis and control, *Rev Bras Clin Med* 10 (2012) 39-45.
- [6] R.D. Pearson, *Esquistossomose (Bilharzíase)*, 2018.
<https://www.msmanuals.com/pt/profissional/doen%C3%A7asinfeciosas/tremat%C3%B3deos-vermes/esquistossomose>. (Accessed 11/11/2019 2019).
- [7] M.K. Sundaraneedi, B.A. Tedla, R.M. Eichenberger, L. Becker, D. Pickering, M.J. Smout, S. Rajan, P. Wangchuk, F.R. Keene, A. Loukas, J.G. Collins, M.S. Pearson,

Polypyridylruthenium(II) complexes exert anti-schistosome activity and inhibit parasite acetylcholinesterases, *PLOS Neglected Tropical Diseases* 11(12) (2017) e0006134.

[8] WHO, Schistosomiasis, 2016.

http://www.who.int/glo/neglected_diseases/schistosomiasis/en/. (Accessed 09/04/2019 2019).

[9] P. Ogongo, T.M. Kariuki, R.A. Wilson, Diagnosis of schistosomiasis mansoni: an evaluation of existing methods and research towards single worm pair detection, *Parasitology* 145(11) (2018) 1355-1366.

[10] C.S. Moreira, L. Casemiro, R. Fisher, E.S. Medeiros, Polymer-based surface plasmon resonance biochip: Construction and experimental aspects, *Res. Biomed. Eng* (2016).

[11] K.G. Weerakoon, G.N. Gobert, P. Cai, D.P. McManus, Advances in the Diagnosis of Human Schistosomiasis, *Clinical microbiology reviews* 28(4) (2015) 939-67.

[12] K.G. Weerakoon, N.G. G, P. Cai, D.P. McManus, Advances in the Diagnosis of Human Schistosomiasis, *Clin Microbiol Rev.* 28 (2015) 939-967.

[13] P. Steinmann, J. Keiser, R. Bos, M. Tanner, J. Utzinger, Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk, *the Lancet* 6(7) (2006) 411.

[14] C.H. King, K. Dickman, D.J. Tisch, Reassessment of the cost of chronic helminth infection: a meta-analysis of disability-related outcomes in endemic schistosomiasis, *The Lancet* 365(9470) (2005) 1561-1569.

[15] D.H. Molyneux, Combating the "other diseases" of MDG 6: changing the paradigm to achieve equity and poverty reduction?, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 102(6) (2008) 509-19.

[16] M.G. Weiss, Stigma and the Social Burden of Neglected Tropical Diseases, *PLOS Neglected Tropical Diseases* 2(5) (2008) 1-6.

[17] D.G. Gray, D.P. McManus, Y.S. Li, G.M. Williams, R. Bergquist, A.G. Ross, Schistosomiasis elimination: lessons from the past guide the future, *Lancet Infect. Dis* 10 (2010) 733-736.

- [18] C. Chuah, G.N. Gobert, B. Lafit, C.C. Heo, C.Y. Leow, Schistosomiasis in Malaysia: A review, *Acta Trop* 190 (2018) 137-143.
- [19] A.G.P. Ross, P.B. Bartley, A.C. Sleight, G.R. Olds, Y. Li, G.M. Williams, D.P. McManus, Schistosomiasis, *N Eng J Med* 346 (2002) 1212-9.
- [20] E.M. Dawson, J.C. Sousa- Figueiredo, N.B. Kabatereine, M.J. Doenhoff, J.R. Stothard, Intestinal Schistosomiasis in the pre school-age children of Lake Albert, Uganda: diagnostic accuracy of a rapid test for detection of anti-schistosome antibodies., *Trans R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 10 (2013) 639-647.
- [21] Y.B. Zhou, M.X. Yang, Q.Z. Wang, G.M. Zhao, J.G. Wei, W.X. Peng, Q.W. Jiang, Field Comparison of immunodisgnostis and parasitological techniques for the detection of schistosomiasis jaconica in the People's Republic of China., *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 6 (2007) 1138-1143.
- [22] R. Hinz, N.G. Schwarz, A. Hahn, H. Frickmann, Serological approaches for the diagnosis of schistosomiasis - A review, *Molecular and cellular probes* 31 (2017) 2-21.
- [23] N. Kato-Hayashi, M. Kirinoki, Y. Iwamura, T. Kanazawa, V. Kitikoon, H. Matsuda, Y. Chigusa, Identification and differentiation of human schistosomes by polymerase chain reaction, *Experimental Parasitology* 3 (2010) 325-329.
- [24] D. Famakinde, Molecular context of *Schistosoma mansoni* transmission in the molluscan environments: A mini-review, *Acta Trop* 176 (2017) 98-104.
- [25] J. Song, C. Liu, S. Bais, M.G. Mauk, H.H. Bau, R.M. Greenberg, Molecular Detection of Schistosome Infections with a Disposable Microfluidic Cassette, *PLoS neglected tropical diseases* 9(12) (2015) e0004318.
- [26] J. Utzinger, K. N'Goran E, C.R. Caffrey, J. Keiser, From innovation to application: social-ecological context, diagnostics, drugs and integrated control of schistosomiasis, *Acta Trop* 120 Suppl 1 (2011) S121-37.
- [27] S.S. Rosatto, R.S. Freire, N. Durán, L.T. Kubota, Biossensores Amperometricos para Determinação de Compostos Fenólicos em Amostras de Interesse Ambiental., *Quimica Nova* 24 (2001) 77-86.
- [28] A. Kawamura, T. Miyata, Biosensors, *Biomaterials Nanoarchitectonics* (2016) 157-176.

- [29] G.J. Kost, N.K. Tran, R.F. Louie, Point-of-care testing: principles, practice, and critical-emergency-disaster medicine, in: R.A. Meyers (Ed.), *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons, New York, 2008.
- [30] C.I. Justino, A.C. Duarte, T.A. Rocha-Santos, Immunosensors in Clinical Laboratory Diagnostics, *Advances in clinical chemistry* 73 (2016) 65-108.
- [31] C. Ding, Y. Ge, J.M. Lin, Aptamer based electrochemical assay for the determination of thrombin by using the amplification of the nanoparticles, *Biosens. Bioelectron* 25 (2010) 1290-1294.
- [32] E. Rasouli, Z. Shahnava, W.J. Basirun, M. Rezayi, A. Avan, M. Ghayour-Mobarhan, R. Khandanlou, M.R. Johan, Advancements in electrochemical DNA sensor for detection of human papilloma virus - A review, *Anal Biochem* 556 (2018) 136-144.
- [33] P. Wang, Q. Liu, *Biomedical Sensors and Measurement*, Zhejiang University, China, 2011.
- [34] S. Neethirajan, V. Ragavan, X. Weng, R. Chand, Biosensors for Sustainable Food Engineering: Challenges and Perspectives, *Biosensors* 23 (2018).
- [35] J.E. Contreras-Naranjo, O. Aguilar, Suppressing Non-Specific Binding of Proteins onto Electrode Surfaces in the Development of Electrochemical Immunosensors, *Biosensors* 9 (2019) 1-23.
- [36] U. Jarocka, R. Sawicka, A. Góra-Sochacka, A. Sirko, W. Zagórski-Ostoj, J. Radecki, H. Radecka, Electrochemical immunosensor for detection of antibodies against influenza A virus H5N1 in hen serum, *Biosens. Bioelectron* 55 (2014) 301-306.
- [37] A. De la Escosura-Muñiz, A. Merkoçi, Electrochemical detection of proteins using nanoparticles: Applications to diagnostics., *Expert Opin. Med. Diagn* 4 (2010) 21-37.
- [38] G. Hughes, K. Westmacott, K.C. Honeychurch, A. Crew, R.M. Pemberton, J.P. Hart, Recent Advances in the Fabrication and Application of Screen-Printed Electrochemical (Bio)Sensors Based on Carbon Materials for Biomedical, Agri-Food and Environmental Analyses, *Biosensors* 50 (2016).
- [39] P. Damborský, J. Švitel, J. Katrlík, Optical biosensors, *Essays Biochem* 60 (2016) 91-100.

- [40] F. Long, A. Zhu, H. Shi, Recent Advances in Optical Biosensors for Environmental Monitoring and Early Warning, *Sensors* 13 (2013) 13928-13948.
- [41] A. Janshoff, H.-J. Galla, C. Steinem, Piezoelectric mass-sensing devices as biosensors—An alternative to optical biosensors?, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl* 39 (2000) 4004-4032.
- [42] R. Raiteri, M. Grattarola, H.-J. Butt, P. Skládal, Micromechanical cantilever-based biosensors, *Sens. Actuators B Chem.* 79 (2001) 115-126.
- [43] S. Patel, R. Nanda, S. Sahoo, E. Mohapatra, Biosensors in Health Care: The Milestones Achieved in Their Development towards Lab-on-Chip-Analysis, *Biochemistry research international* 2016 (2016) 3130469.
- [44] L.C. Brazaca, Desenvolvimento de biossensores para auxílio do diagnóstico do mal de Alzheimer, para quantificação rápida de melatonina e para determinação simples do traço genético de anemia falciforme., in: U.d.S. Paulo (Ed.) São Carlos, 2019, p. 185.
- [45] R.F. Furtado, R.A.F. Dutra, C.R. Alves, M.G.R. Pimenta, M.I.F. Guedes, Aplicações de Biossensores na Análise da Qualidade de Alimentos, in: E.A. Tropical (Ed.) Fortaleza, 2008, p. 22p.
- [46] IUPAC, reconsider new biosensor definition, *Biosensors & Bioelectronics* 13 (1998) I-I.
- [47] Y. Lei, W. Chen, A. Mulchandani, Microbial biosensors., *Analytica Chimica Acta* 568 (2006) 200-210.
- [48] B.W. Park, D.Y. Yoon, D.S. Kim, Recent progress in bio-sensing techniques with encapsulated enzymes, *Biosensors & Bioelectronics* 26 (2010) 1-10.
- [49] E.R. Hirst, Y.J. Yuan, W.L. Xu, J.E. Bronlund, Bond-rupture immunosensors--a review, *Biosens Bioelectron* 23(12) (2008) 1759-68.
- [50] I. Palchetti, M. Mascini, ,Nucleic acid biosensors for environmental pollution monitoring, *Analyst* 133 (2008) 846-854.
- [51] F.R.R. Teles, L.R. Fonseca, Trends in DNA biosensors, *Talanta* 77 (2008) 606-623.

- [52] N.J. Ronkainen, H.B. Halsall, W.R. Heineman, Electrochemical biosensors, *Chemical Society Review* 39 (2010) 1747-1763.
- [53] S. SONG, H. XU, C. FAN, Potential Diagnostic Applications of Biosensors: Current and Future Directions, *International Journal of Nanomedicine* 1 (2006) 433-440.
- [54] D.R. The´venot, K. Toth, R.A. Durst, G.S. Wilson, Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification, *Biosensors & Bioelectronics* 16 (2001) 121-131.
- [55] F. Kuralay, H. Özyörük, A. Yildiz, Potentiometric enzyme electrode for urea determination using immobilized urease in poly(vinylferrocenium) film, *Sensors and Actuators B Chemical* 109 (2005) 194-199.
- [56] N. Kumar, Y. Hu, S. Singh, B. Mizaikoff, Emerging biosensor platforms for the assessment of water-borne pathogens, *Analyst* 143(2) (2018) 359-373.
- [57] E. Bakker, E. Pretsch, Potentiometric sensors for trace-level analysis, *Trends in analytical chemistry : TRAC* 24(3) (2005) 199-207.
- [58] C. Okafor, D. Grooms, E. Alocilja, S. Bolin, Fabrication of a Novel Conductometric Biosensor for Detecting Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis Antibodies, *Sensors* 8(9) (2008) 6015-6025.
- [59] D. Grieshaber, M. R., J. Vörös, R. Reimhult, Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures, *Sensors (Basel)* 8 (2008) 1400-1458.
- [60] M. Trojanowicz, Application of Conducting Polymers in Chemical Analysis
Microchimica Acta 143(2-3) (2003) 75-91.
- [61] B. Uslu, S.A. Ozkan, Electroanalytical methods for the determination of pharmaceuticals: a review of recent trends and developments, *Analytical letters* 44 (2011) 2644-2702.
- [62] D.G. Rackus, M.H. Shamsi, A.R. Wheeler, Electrochemistry, biosensors and microfluidics: A convergence of fields, *Chem Soc Rev* 44 (2015) 5320-5340.
- [63] W.F. Pacheco, F.S. Semaan, V.G.K. Almeida, A.G.S.L. Ritta, R.Q. Aucélio, Voltammetry: A Brief Review About Concepts, *Revista Virtual de Química* 5(4) (2013).

- [64] L.A. Carvalho, A.R. Andrade, P.R. Bueno, Espectroscopia de impedância eletroquímica aplicada ao estudo das reações heterogêneas em ânodos dimensionalmente estáveis, *Quim Nova* 29 (2006) 796-804.
- [65] C. Alexander, M. Sadiku, *Fundamentals of electric circuits* McGraw-Hill 2006.
- [66] E.P. Randviir, C.E. Banks, Electrochemical impedance spectroscopy: an overview of bioanalytical applications, *Analytical Methods* 5(5) (2013) 1098.
- [67] D.A.C. Brownson, A.C. Lacombe, M. Gomez-Mingot, C.E. Banks, Graphene oxide gives rise to unique and intriguing voltammetry, *RSC Adv* 2 (2012) 665-668.
- [68] M. Nirschl, F. Reuter, J. Voros, Review of transducer principles for label-free biomolecular interaction analysis, *Biosensors* 1(3) (2011) 70-92.
- [69] E. Katz, I. Willner, Probing biomolecular interactions at conductive and semiconductive surfaces by impedance spectroscopy: Routes to impedimetric immunosensors, dna-sensors, and enzyme biosensors., *Electroanalysis* 15 (2003) 913-947.
- [70] R.J. Pei, Z.L. Cheng, E.K. Wang, X.R. Yang, Amplification of antigen-antibody interactions based on biotin labeled protein-streptavidin network complex using impedance spectroscopy, *Biosensors & Bioelectronics* 16 (2001) 355-361.
- [71] M. Gerard, A. Chaubey, B.D. Malhotra, Application of conducting polymers to biosensors., *Biosens Bioelectron* 5 (2002) 345-59.
- [72] M. Mehrvar, M. Abdi, Recent Developments, Characteristics, and Potential Applications of Electrochemical Biosensors, *Analytical Sciences* 20 (2004) 1113-1126.
- [73] A. Chaubey, B.D. Malhotra, Mediated biosensors, *Biosens Bioelectron* 17 (2002) 441-456.
- [74] K. Thoren, The Role of Surface Plasmon Resonance in Clinical Laboratories An evolving platform has the potential to make biosensors more integrated into clinical care, *Clinical Laboratory News*, New York, 2019.
- [75] L. Vladimír, S.D. Alexeev, N.F. David, A.A. Sanford, Photonic Crystal Glucose-Sensing Material for Noninvasive Monitoring of Glucose in Tear Fluid. , *Clinical Chemistry* (2004) 2353-2360.

- [76] M. Pohanka, Piezoelectric biosensor for the determination of Tumor Necrosis Factor Alpha, *Talanta* 178 (2018) 970-973.
- [77] C.I.L. Justino, T.A.P. Rocha-Santos, A.C. Duarte, Advances in point-of-care technologies with biosensors based on carbon nanotubes, *Trends Anal. Chem* 45 (2013) 24-36.
- [78] J. Lin, H. Ju, Electrochemical and chemiluminescent immunosensors for tumor markers, *Biosens Bioelectron* 20 (2005) 1461-1470.
- [79] F.S. Felix, L. Angnes, Electrochemical immunosensors - A powerful tool for analytical applications, *Biosensors & bioelectronics* 102 (2018) 470-478.
- [80] E.K. Wujcik, H. Wei, X. Zhang, J. Guo, X. Yan, N. Sutrave, S. Wei, Z. Guo, Antibody nanosensors: a detailed review *RSC Adv* 4 (2014) 43725-43745.
- [81] M. Hasanzadeh, N. Shadjou, E. Omidinia, M. de la Guardia, Optical immunosensing of effective cardiac biomarkers on acute myocardial infarction, *Trends Anal Chem* 51(158-168) (2013).
- [82] F. Ricci, G. Volpe, L. Micheli, G. Palleschi, A review on novel developments and applications of immunosensors in food analysis, *Anal. Chim Acta* 605(111-129) (2007).
- [83] Y. Xu, X. Xie, Y. Duan, L. Wang, Z. Cheng, J. Cheng, A review of impedance measurements of whole cells, *Biosensors & bioelectronics* 77 (2016) 824-836.
- [84] S. Wang, T. Yin, S. Zeng, H. Che, F. Yang, X. Chen, G. Shen, Z. Wu, A piezoelectric immunosensor using hybrid self-assembled monolayers for detection of *Schistosoma japonicum*, *PloS one* 7(1) (2012) e30779.
- [85] Y. Chou, H. Chiou, C. Tiu, S. Chiou, S. Lee, G. Hung, S. Wu, B. Kuo, R. Lee, J. Chiang, T. Chang, C. Yu, Duplex doppler ultrasound of hepatic schistosomiasis japonica: A study of 47 patient, *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 68(18-23) (2003).
- [86] C.W. Cheng, C.K. Chen, Y.S. Chen, L.Y. Chen, Determination of *Schistosoma japonicum* circulating antigens in dilution serum by piezoelectric immunosensor and S/N enhancement, *Biosensors & bioelectronics* 24(1) (2008) 136-40.

- [87] M. Pohanka, P. Skladal, Electrochemical biosensors – principles and applications, Review, J. Appl. Biomed 6 (2008) 57-64.
- [88] R. Bojorge, I. Ninoska, M. Fortes, S.A. Medeiros, B. valdman, Construcción de un Inmunosensor Amperométrico utilizando Apirasa de Solanum tuberosum para la Detección de Esquistosomiasis, Inf. tecnol. 20 (2009) 125-134.
- [89] W. Deng, B. Xu, H. Hu, J. Li, W. Hu, S. Song, Z. Feng, C. Fan, Diagnosis of schistosomiasis japonica with interfacial co-assembly-based multi-channel electrochemical immunosensor arrays, Scientific reports 3 (2013) 1789.
- [90] Z. Wu, J. Wu, S. Wang, G. Shen, R. Yu, An amplified mass piezoelectric immunosensor for Schistosoma japonicum, Biosensors & bioelectronics 22(2) (2006) 207-12.
- [91] 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.
- [92] L. Xu, J. Du, N. He, Fabrication of magnetic porous pseudo-carbon paste electrode electrochemical biosensor and its application in detection of schistosoma egg antigen, Electrochem. commun 12 (2010) 1329-1332.
- [93] J. Nie, Y. Zhang, Superhydrophobic surface-based magnetic electrochemical immunoassay for detection of Schistosoma japonicum antibodies, Biosensors & bioelectronics 49 (2010) 23-28.
- [94] J. Odundo, N. Noah, D. Andala, J. Kiragu, M. Ndikau, G. Kimani, J. Mwatha, Spectro-electrochemical characterization of anti-schistosoma- gold nanoparticles conjugate for use in immunoassays,, J. Kenya. Chem. Soc. 9 (2016) 35-45.
- [95] X. Quing, X. Chu, G. Shen, R. Yu, Electrochemical detection of Schistosoma japonicum antibody using biocatalytic deposition, , Anal. Lett 41 (2008) 2237-2250.
- [96] X. Chu, Z. Xiang, X. Fu, S. Wang, G. Shen, R. Yu, Silver-enhanced colloidal gold metalloimmunoassay for Schistosomajaponicum antibody detection, J. Immunol. Methods. 301 (2005) 77-88.
- [97] H. Zhou, J. Liu, J.J. Xu, S. Zhang, H.Y. Chen, Advances in DNA/RNA detection using nanotechnology, Advances in clinical chemistry 91 (2019) 31-98.

- [98] P. He, L.G. Song, H. Xie, J.Y. Liang, D.Y. Yuan, Z.D. Wu, Z.Y. Lv, Nucleic acid detection in the diagnosis and prevention of schistosomiasis, *Infect Dis Poverty* 5 (2016) 25.
- [99] L.I. Gomes, M.J. Enk, A. Rabello, Diagnosing schistosomiasis: where are we?, *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 47 (2014) 3-11.
- [100] C.A. Gordon, D.J. Gray, G.N. Gobert, D.P. McManus, DNA amplification approaches for the diagnosis of key parasitic helminth infections of humans, *Molecular and cellular probes* 25(4) (2011) 143-52.
- [101] T. Kumagai, R. Furushima-Shimogawara, H. Ohmae, T.P. Wang, S. Lu, R. Chen, L. Wen, N. Ohta, Detection of early and single infections of *Schistosoma japonicum* in the intermediate host snail, *Oncomelania hupensis*, by PCR and loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 83 (2010) 542-548.
- [102] I. Abbasi, C.H. King, E.M. Muchiri, J. Hamburger, Detection of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium* DNA by loop-mediated isothermal amplification: identification of infected snails from early prepatency, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 83 (2010) 427-432.
- [103] O.P. Akinwale, R.A. Kane, D. Rollinson, J.R. Stothard, M.B. Ajayi, D.O. Akande, M.O. Ogungbemi, C. Duker, P.V. Gyang, M.A. Adeleke, Molecular approaches to the identification of *Bulinus* species in south-west Nigeria and observations on natural snail infections with schistosomes, *J. Helmenthol.* 85 (2011) 283-293.
- [104] J. Hertel, K. Kedves, A.H. Hassan, B. Haberl, W. Haas, Detection of *Schistosoma mansoni* cercariae in plankton samples by PCR., *Acta Trop.* 91 (2004) 43-46.
- [105] Y.W. Hung, J. Remais, Quantitative detection of *Schistosoma japonicum* cercariae in water by real-time PCR, *Plos Negl Trop Dis* 11 (2008) e337.
- [106] N. Lodh, J.M. Naples, K.M. Bosompem, J. Quartey, C.J. Shiff, Detection of parasite-specific DNA in urine sediment obtained by filtration differentiates between single and mixed infections of *Schistosoma mansoni* and *S. haematobium* from endemic areas in Ghana., *Plos ONE* 3 (2014) e91144.
- [107] O.A. Ibrionke, A.E. Phillips, A. Garba, S.M. Lamine, C. Shiff, Diagnosis of *Schistosoma haematobium* by detection of specific DNA fragments from filtered urine samples, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 84 (2011) 998-1001.

- [108] L.A. Pontes, E. Dias-Neto, A. Rabello, Detection by polymerase chain reaction of *Schistosoma mansoni* DNA in human serum and feces, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 66 (2002) 157-162.
- [109] C.M. Xia, R. Rong, Z.X. Lu, C.J. Shi, J. Xu, H.Q. Zhang, W. Gong, W. Luo, *Schistosoma japonicum*: a PCR assay for the early detection and evaluation of treatment in a rabbit model, *Exp. Parasitol.* 121 (2009) 175-179.
- [110] M.C. Carvalho Espirito-Santo, M.V. Alvarado-Mora, P.L. Silva Pinto, T. de Brito, L. Botelho-Lima, A.R. Heath, M.G. Amorim, E. Dias-Neto, P.P. Chieffi, J.R. Rebello Pinho, e. al., Detection of *Schistosoma mansoni* infection by TaqMan (R) Real-Time PCR in a hamster model, *Exp. Parasitol.* 43 (2014) 83-89.
- [111] G.S. Santos, R. Caldas, F.L. Melo, I.S. Bruscky, M.A.L. Silva, L.B. Wanderley, C.A.S. Andrade, M.D.L. Oliveira, Label-free nanostructured biosensor for *Schistosoma mansoni* detection in complex biological fluids, *Talanta* 204 (2019) 395-401.
- [112] H. Zhou, J. Liu, J.J. Xu, S.S. Zhang, H.Y. Chen, Optical nano-biosensing interface via nucleic acid amplification strategy: construction and application, *Chem. Soc. Rev.* 47 (2018) 1996-2019.
- [113] X. Huang, Y. Liu, B. Yung, Y. Xiong, X.Y. Chen, Nanotechnology-enhanced no-wash biosensors for in vitro diagnostics of cancer,, *ACS Nano* 11 (2017) 5238-5292.
- [114] W. Zhou, X. Gao, D. Liu, X.Y. Chen, Gold nanoparticles for in vitro diagnostics, *Chem. Soc. Rev.* 115 (2015) 10575-10636.
- [115] T.A.P. Rocha-Santos, Sensors and biosensors based on magnetic nanoparticles, *Trends Anal. Chem.* 62 (2014) 28-36.
- [116] H. Zhou, J. Liu, S. Zhang, Quantum dot-based photoelectric conversion for biosensing applications, *Trends Anal. Chem.* 67 (2015) 56-73.
- [117] C. Tan, X.J. Cao, Q. Wu, J. He, X. Yang, J. Zhang, Recent advances in ultrathin two-dimensional nanomaterial, *Chem. Rev.* 117 (2017) 6225-6331.
- [118] J. Cancino, V.S. Marangoni, V. Zucolotto, Nanotechnology in medicine: concepts and concerns, *Química Nova* 37(3) (2014).

- [119] G.S. Santos, C.A. Andrade, I.S. Bruscky, L.B. Wanderley, F.L. Melo, M.D. Oliveira, Impedimetric nanostructured genosensor for detection of schistosomiasis in cerebrospinal fluid and serum samples, *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 137 (2017) 163-169.
- [120] A. Abi, E.E. Ferapontova, Unmediated by DNA electron transfer in redox-labeled DNA duplexes end-tethered to gold electrodes, *J. Am. Chem. Soc.* 134 (2012) 14499-14507.
- [121] D. Kang, R.J. White, F. Xia, X. Zuo, A. Vallée-Belisle, K.W. Plaxco, DNA biomolecular-electronic encoder and decoder devices constructed by multiplex biosensors, *NPG Asia Mater* 4 (2012) 1-6.
- [122] A.J. Webb, R. Kelwick, M.J. Doenhoff, N. Kylilis, J.T. MacDonald, K.Y. Wen, C. McKeown, G. Baldwin, T. Ellis, K. Jensen, P.S. Freemont, A protease-based biosensor for the detection of schistosome cercariae, *Scientific reports* 6 (2016) 24725.
- [123] 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.
- [124] L. Xu, J. Du, Y. Deng, N. He, Fabrication of magnetic porous pseudo-carbon paste electrode electrochemical biosensor and its application in detection of schistosoma egg antigen, *Electrochemistry Communications* 12(10) (2010) 1329-1332.
- [125] 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(1) (2012) 23-8.
- [126] J. Odundo, N. Naumih, D. Andala, J. Kiragu, M. Ndikau, G. Kimani, J. Mwatha, Spectroelectrochemical Characterization Of Anti-Schistosoma-Gold Nanoparticle Conjugate For Use In Immunoassays, *Journal Kenya Chemical Society* 9 (2016).
- [127] X. Qing, X. Chu, G. Shen, R. Yu, Electrochemical Detection of *Schistosoma Japonicum* Antibody Using Biocatalytic Deposition, *Analitical Letters* 41(12) (2008) 2237-2250.