



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

GABRIEL JUNQUETTI MATTOS

**IMUNOSSENSOR ELETROQUÍMICO BASEADO EM
ELETRODO IMPRESSO DE CARBONO MODIFICADO COM
COMPÓSITO DE GRAFENO/QDsZnO PARA DIAGNÓSTICO
DE ESTRONGILOIDÍASE**

GABRIEL JUNQUETTI MATTOS

**IMUNOSSENSOR ELETROQUÍMICO BASEADO EM
ELETRODO IMPRESSO DE CARBONO MODIFICADO COM
COMPÓSITO DE GRAFENO/QDsZnO PARA DIAGNÓSTICO
DE ESTRONGILOIDÍASE**

Dissertação apresentada ao Departamento de Química da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Elen Julciléia Romão Sartori Braz.

Londrina
2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

M444i Mattos, Gabriel Junquetti.

Imunossensor Eletroquímico baseado em eletrodo impresso de carbono modificado com compósito de grafeno/QDsZnO para diagnóstico de estrogiloidíase / Gabriel Junquetti Mattos. - Londrina, 2021.
79 f. : il.

Orientador: Elen Julciléia Romão Sartori Braz.

Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2021.

Inclui bibliografia.

1. Análise Multivariada - Tese. 2. Circuitos Flexíveis - Tese. 3. Doenças Tropicais - Tese. 4. Eletrodos Impressos - Tese. I. Braz, Elen Julciléia Romão Sartori . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

CDU 54

GABRIEL JUNQUETTI MATTOS

**IMUNOSSENSOR ELETROQUÍMICO BASEADO EM
ELETRODO IMPRESSO DE CARBONO MODIFICADO COM
COMPÓSITO DE GRAFENO/QDsZnO PARA DIAGNÓSTICO
DE ESTRONGILOIDÍASE**

Dissertação apresentada ao Departamento de Química da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof.^a Dr.^a Elen Julciléia Romão Sartori
Braz
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. César Ricardo Teixeira Tarley
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Edivaldo Egea Garcia
Universidade Estadual de Maringá - UEM

Londrina, 26 de Fevereiro de 2021.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, à Deus pela vida e pela oportunidade de estudar e tentar compreender o mínimo deste sistema complexo por Ele criado, chamado universo.

Aos meus pais, Roberto e Claudia, que sempre me proporcionaram grandes oportunidades de estudo, e ao meu irmão, Miguel, pela parceria de sempre. Obrigado pelo apoio, conselhos, conversas, união e todos os momentos de alegria que passamos juntos.

À minha orientadora, Profa. Elen Sartori, por todas as oportunidades e ensinamentos durante meus seis anos de pesquisa científica dentro do Laboratório de Eletroanalítica e Sensores.

Aos professores Robert Dekker e Aneli Dekker por todos os ensinamentos e por fornecerem biomateriais para construção de dispositivos bioeletroquímicos.

Ao Prof. George Knopf da Western University no Canadá pelos ensinamentos e oportunidades durante meu estágio de pesquisa.

À Profa. Fabiana de Paula, do Instituto de Medicina Tropical da USP de São Paulo por fornecer os materiais de bioreconhecimento e amostras de pacientes.

À Profa. Ieda Scarmínio e ao Gustavo Galo pelo auxílio no tratamento multivariado dos resultados.

Aos meus colegas de curso do mestrado e também colegas de laboratório pela parceria.

Aos professores César Tarley e Edivaldo Garcia por contribuírem na correção deste trabalho de mestrado.

À Universidade Estadual de Londrina pelo ensino público e de qualidade desde a minha graduação em Química Bacharelado até o Mestrado em Química Analítica; e também aos órgãos de fomento, especialmente a CAPES pela minha bolsa de mestrado.

MATTOS, Gabriel Junquetti. **Imunossensor eletroquímico baseado em eletrodo impresso de carbono modificado com compósito de grafeno/QDsZnO para diagnóstico de estrogiloidíase**. 2021. 79 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

RESUMO

Um imunossensor eletroquímico foi desenvolvido para o diagnóstico rápido de estrogiloidíase usando o extrato somático total solúvel do antígeno imobilizado eletrostaticamente na superfície de um eletrodo impresso de carbono, modificado com compósito de grafeno/*quantum dots* de óxido de zinco, como plataforma de biorreconhecimento. O monitoramento foi baseado em alterações nos parâmetros eletroquímicos do dispositivo em função da ligação antígeno-anticorpo na região interfacial. A caracterização do imunossensor foi realizada por espectroscopia de impedância eletroquímica e voltametria cíclica/linear, avaliando-se o biorreconhecimento impedimétrico/voltamétrico do complexo antígeno-anticorpo pelo uso do grupo redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ como sonda eletroquímica. O imunossensor foi capaz de detectar anticorpos em amostras soro positivas com base no perfil voltamétrico e monitoramento de impedância absoluta. A análise discriminante por mínimos quadrados parciais apresentou um coeficiente de determinação igual a 0,98, indicando que o modelo é capaz de classificar corretamente as amostras com base no perfil voltamétrico. A análise dos quadrados médios da raiz da validação cruzada (0,126), do erro dos quadrados médios da raiz da calibração (0,124) e do erro dos quadrados médios da raiz da previsão (0,100) para a variável latente indicam a ótima precisão do modelo. Com base na curva ROC determinou-se os pontos de corte para as medidas de impedância eletroquímica, obtendo-se classificação 100% correta para pacientes imunocompetentes, 9,6% de falsos positivos e 1,25% de falsos negativos no caso de imunodeprimidos. O dispositivo proposto apresentou excelente especificidade na presença de outras helmintíases, incluindo ascaridíase, difilobotríase, himenolepiase, cisticercose e tricuriase, utilizando VC e EIE como técnicas de monitoramento.

Palavras-chave: análise multivariada; circuitos flexíveis; doenças tropicais; eletrodos impressos.

MATTOS, Gabriel Junquetti. **Electrochemical immunosensor based on carbon printed electrode modified with graphene/ZnOQDs composite for the diagnosis of strongyloidiasis**. 2021. 79 p. Dissertation (Master in Chemistry) – State University of Londrina, Londrina, 2021.

ABSTRACT

An electrochemical immunosensor was developed for the rapid diagnosis of strongyloidiasis using the total soluble somatic extract of the antigen electrostatically immobilized on the surface of a printed carbon electrode, modified with graphene/zinc oxide quantum dots composite, as a biorecognition platform. The monitoring was based on changes in the electrochemical parameters of the device due to the antigen-antibody binding in the interfacial region. The immunosensor was characterized by electrochemical impedance spectroscopy and cyclic/linear voltammetry, evaluating the impedimetric/voltammetric biorecognition of the antigen-antibody complex using the redox group $K_4Fe(CN)_6$ as an electrochemical probe. The immunosensor was able to detect antibodies in positive serum samples based on the voltammetric profile and absolute impedance monitoring. Partial least squares discriminating analysis showed a coefficient of determination equal to 0.98, indicating that the model is capable of correctly classifying samples based on the voltammetric profile. The analysis of the Root Mean Squares of Cross-Validation (0.126), the error of the Root Mean Squares Error of Calibration (0.124), and the error of the Root Mean Squares Error of Prediction (0.100) for the latent variable indicate the optimal precision of the model. Based on the ROC curve, the cutoff points were determined for the electrochemical impedance measurements, obtaining a 100% correct classification for immunocompetent patients, 9.6% false positives and 1.25% false negatives in the case of immunocompromised patients. The proposed device presented excellent specificity in the presence of other helminthiasis, including ascariasis, diphyllobotriasis, himenolepiasis, cysticercosis and tricuriasis, using VC and EIE as monitoring techniques.

Keywords: multivariate analysis; flexible circuits; tropical diseases; printed electrodes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 -** Esquema de uma reação enzimática em um biossensor eletroquímico catalítico.....17
- Figura 2 -** Função senoidal da variação de corrente e potencial em função do tempo para monitoramento de impedância eletroquímica.....20
- Figura 3 -** (I) Representação de um biossensor capacitivo/impedimétrico; (II) e (III) Circuitos elétricos para representar (IV) Gráfico de Nyquist do circuito de Randles (mostrado no painel lateral)23
- Figura 4 -** Curva de Potencial vs. Tempo para (I) voltametria cíclica e (III) voltametria linear; representação de um voltamograma (II) cíclico e (IV) linear24
- Figura 5 -** Ciclo biológico do *Strongyloides stercoralis*, causador da estrogiloidíase30
- Figura 6 -** Representação da estrutura superficial da cutícula de uma larva de *Strongyloides stercoralis*33
- Figura 7 -** Fluxograma ilustrando as etapas do processo de síntese dos QDsZnO37
- Figura 8 -** Processo de construção do imunossensor voltamétrico/impedimétrico proposto EIC/G-QDsZnO/Ag(estr.).....39
- Figura 9 -** (I) Difratoograma de Raio-X (II) Espectro de absorção (III) Imagem de microscopia eletrônica de varredura e (IV) Diagrama de distribuição de tamanho para a amostra de QDsZnO.....44
- Figura 10 -** Voltamogramas cíclicos (50 mV s^{-1}) obtidos utilizando (—) EIC, (—), EIC/G-QDsZnO, (—) EIC/G-QDsZnO/Ag(estr.), (—) EIC/G-QDsZnO/Ag(estr.)/(–estr.) e (—) EIC/G-QDsZnO/Ag(estr.)/Ac(+estr.) em tampão Tris-HCl ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,2) contendo $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$46
- Figura 11 -** Diagramas de Nyquist obtidos utilizando (■) EIC, (●), EIC/G-QDsZnO, (■) EIC/G-QDsZnO/Ag(estr.), (▲) EIC/G-QDsZnO/Ag(estr.)/(–estr.) e (●) EIC/G-QDsZnO/Ag(estr.)/Ab(+estr.) em tampão Tris-HCl ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,2) contendo $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$. *Inserido*: expansão da região de alta frequência e circuito de Randles. *Parâmetros instrumentais*: intervalo de frequência de 10

	mHz a 100 kHz; amplitude de 10 mV.....	48
Figura 12 -	Diagramas de Nyquist obtidos utilizando (■) EIC/G-QDsZnO/Ag(estr.), (●) EIC/G-QDsZnO/Ag(estr.)/Ab(+1estr.), (●) EIC/G-QDsZnO/Ag(estr.)/Ab(+2estr.) e (●) EIC/G-QDsZnO/Ag(estr.)/Ab(+3estr.) em tampão Tris-HCl (0,1 mol L ⁻¹ , pH 7,2) contendo [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-} 1,0 mmol L ⁻¹ . <i>Parâmetros instrumentais:</i> intervalo de frequência de 10 mHz a 100 kHz; amplitude de 10 mV	49
Figura 13 -	Gráfico em barras referente ao estudo da concentração (I) do composto G/QDsZnO e (II) do antígeno de <i>S. stercoralis</i> no dispositivo EIC/G-QDsZnO/Ag(estr.); (III) estudo do tempo de incubação das amostras de soro de pacientes	51
Figura 14 -	Gráfico dos pontos da VL1 versus amostras para discriminar soros positivo (▲; ▲) e negativo (●; ●) com base no perfil voltamétrico da sonda [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-} (1,0 mmol L ⁻¹ , Tris-HCl 0,1 mol L ⁻¹ , pH 7,2) utilizando o imunossensor de estrogiloidíase. A cor preta corresponde às pontuações de calibração (amostras de treinamento) e as pontuações em cinza às amostras de validação (amostras de teste) do modelo AD-MQP	53
Figura 15 -	Modelo de predição por AD-MQP para soro negativo (I) e soro positivo (II) a partir do perfil voltamétrico da sonda [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-} (1,0 mmol L ⁻¹ , Tris-HCl 0,1 mol L ⁻¹ , pH 7,2) utilizando o imunossensor de estrogiloidíase; sendo (●) amostras de treinamento de soro negativas, (●) amostras de validação de soro negativas, (▲) amostras de treinamento de soro positivas, (▲) amostras de validação de soro positivas e (— — —) valor limite	54
Figura 16 -	Predição do modelo AD-MQP para soro negativo a partir do perfil voltamétrico da sonda [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-} (1,0 mmol L ⁻¹ , Tris-HCl 0,1 mol L ⁻¹ , pH 7,2) utilizando o imunossensor de estrogiloidíase com a inclusão do teste de especificidade para outras helmintíases, sendo (●) amostras de treinamento negativas, (■) ascaridíase, (▼) difilobotríase, (►) himenolepíase, (●) cisticercose, (◆) tricuriase, (▲) amostras de treinamento positivas, (▲) amostras de validação positivas e (— — —) o valor limite.....	59
Figura 17 -	Modelo de predição por AD-MQP para (I) sangue negativo e (II)	

	sangue positivo (II) a partir do perfil voltamétrico da sonda $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ (1,0 mmol L ⁻¹ , Tris-HCl 0,1 mol L ⁻¹ , pH 7,2) utilizando o imunossensor de estrogiloidíase; sendo (●) amostras de treinamento de sangue negativas, (●) amostras de validação de sangue negativas, (▲) amostras de treinamento de sangue positivas, (▲) amostras de validação de sangue positivas e (— — —) valor limite61	
Figura 18 -	Voltamogramas lineares (50 mV s ⁻¹) obtidos utilizando o EIC/G-QDsZnO/Ag(estr.) para amostra de sangue (—) negativa e (—) positiva, em tampão Tris-HCl (0,1 mol L ⁻¹ , pH 7,2) contendo $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 1,0 mmol L ⁻¹ 62	
Figura 19 -	Diagrama de bode para (●) EIC/G-QDsZnO/Ag(estr.) e (●) EIC/G-QDsZnO/Ag(estr.)/Ab(+estr.); intervalo de frequência: 10 mHz – 100 kHz, na presença da sonda $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ (1,0 mmol L ⁻¹ , Tris-HCl 0,1 mol L ⁻¹ , pH 7,2)..... 63	
Figura 20 -	Histogramas e distribuição normal dos valores de impedância monitorados a 40 Hz para amostras (I) Negativas e (II) Positivas para estrogiloidíase, utilizando o dispositivo EIC/G-QDsZnO/Ag(estr.) na presença da sonda $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ (1,0 mmol L ⁻¹ , Tris-HCl 0,1 mol L ⁻¹ , pH 7,2)..... 64	
Figura 21 -	(I) Curva ROC para determinação do <i>cutoff</i> de impedância e (II) Disposição gráfica dos pontos de impedância para amostras positivas e negativas 66	
Figura 22 -	(I) Curva ROC para determinação do <i>cutoff</i> de impedância e (II) Disposição gráfica dos pontos de impedância para amostras positivas e negativas de pacientes imunocompetentes e imunodeprimidos..... 67	

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Resultados da classificação AD-MQP para duas classes com base no perfil voltamétrico do imunossensor para pacientes com soro positivo e negativo para estrogiloidíase.....55
- Tabela 2** - Resultados da análise dos soros de pacientes empregando modelo AD-MQP associado ao imunossensor de estrogiloidíase projetado; e resultados do método comparativo ELISA..... 55
- Tabela 3** - Resultados da análise dos soros de pacientes empregando modelo AD-MQP associado ao imunossensor de estrogiloidíase projetado; e resultados do método comparativo ELISA para diferentes helmintíases.....59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ac	Anticorpo
ACE	Antígeno carcinoembrionário
AD-MQP	Análise discriminante de mínimos quadrados parciais
Ag	Antígeno
APE	Antígeno prostático específico
APV	Álcool polivinílico
CMB	Carboximetil botriosferana
EIC	Eletrodo impresso de carbono
EIC/G	Eletrodo impresso de carbono modificado com grafeno
EIC/G-QDsZnO	Eletrodo impresso de carbono modificado com compósito de grafeno/ <i>quantum dots</i> de óxido de zinco
EIC/G-QDsZnO/Ag(estr.)	Eletrodo impresso de carbono modificado com compósito de grafeno/ <i>quantum dots</i> de óxido de zinco e antígeno de estrogiloidíase
EIC/G-QDsZnO/Ag(estr.)/Ab(+estr.)	Eletrodo impresso de carbono modificado com compósito de grafeno/ <i>quantum dots</i> de óxido de zinco, antígeno de estrogiloidíase e amostra positiva
EIC/G-QDsZnO/Ag(estr.)/(-estr.)	Eletrodo impresso de carbono modificado com compósito de grafeno/ <i>quantum dots</i> de óxido de zinco, antígeno de estrogiloidíase e amostra negativa
EIE	Espectroscopia de Impedância Eletroquímica
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EQMRC	Erro dos quadrados médios da raiz da calibração
EQMPR	Erro dos quadrados médios da raiz da previsão
Es	Estrongiloidíase
FI	Fluorescência indireta
FPM	Função probabilidade de massa
G	Grafeno
HI	Hemaglutinação indireta
IEE	Imunoensaio enzimático
NP	Nanopartícula
NTC	Nanotubo de carbono
OG	Óxido de grafeno

PIE	Ponto isoeletrico
PVP	Polivinilpirrolidona
QDs	<i>Quantum dots</i>
QMRVC	Quadrados médios da raiz da validação cruzada
ROC	<i>Receiver Operating Curve</i>
SAB	Soro albumina bovina
VC	Voltametria cíclica
VL	Voltametria linear
VL1	Variável latente 1

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	14
1.2	BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS.....	16
1.2.1	Imunossensores Eletroquímicos.....	17
1.2.2	Imunossensores Impedimétricos/Voltamétricos	18
1.2.3	Eletrodo Impresso de Carbono.....	25
1.2.4	Nanotecnologia no Sistema de Transdução	26
1.3	MODELOS ESTATÍSTICOS APLICADOS AO IMUNOSSENSORIAMENTO.....	27
1.4	ESTRONGILOIDÍASE	28
1.4.1	Ciclo Biológico e Sintomas	28
1.4.2	Diagnóstico Clínico.....	31
1.4.3	Extratos antigênicos de estrongiloidíase	32
2	OBJETIVOS	34
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
3	PARTE EXPERIMENTAL	35
3.1	REAGENTES E SOLUÇÕES.....	35
3.2	EQUIPAMENTOS	35
3.3	OBTENÇÃO DA DISPERSÃO DE GRAFENO.....	36
3.4	SÍNTESE DOS QUANTUM DOTS DE ZNO	36
3.5	OBTENÇÃO DO ANTÍGENO DE <i>STRONGYLOIDES STERCORALIS</i>	37
3.6	CONSTRUÇÃO DO IMUNOSSENSOR ELETROQUÍMICO E PROCEDIMENTO ANALÍTICO	38
3.7	OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE SORO DE PACIENTES	40
3.8	MÉTODO COMPARATIVO ELISA.....	40
3.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS	41
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS QUANTUM DOTS DE ZNO.....	43
4.2	CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DO IMUNOSSENSOR EIC/G- QDsZNO/AG(ES)	44

4.3	OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS PARA CONSTRUÇÃO DO IMUNOSENSOR.....	49
4.4	APLICAÇÃO DO MODELO DE AD-MQP PARA CLASSIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE SORO SANGUÍNEO	52
4.5	PROVA DE CONCEITO: ESPECIFICIDADE DO IMUNOSENSOR PROPOSTO NA PRESENÇA DE DIFERENTES HELMINTÍASES.....	57
4.6	APLICAÇÃO DO MODELO DE AD-MQP PARA CLASSIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE SANGUE.....	60
4.7	DIAGNÓSTICO DE ESTRONGILOIDÍASE PARA PACIENTES IMUNOCOMPETENTES E IMUNODEPRIMIDOS BASEADO EM MEDIDAS DE EIE.....	62
5	CONCLUSÕES	69
	REFERÊNCIAS	70

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

O crescente campo de dispositivos bioeletrônicos lida com técnicas eletrônicas avançadas para atender as necessidades do setor de saúde, bem como outras aplicações no monitoramento ambiental e de alimentos (GRIESHABER et al., 2008). Este tópico interdisciplinar integra eletrônica geral e ciência da computação com biologia, medicina e ciências aplicadas, a fim de solucionar problemas relacionados ao *design* de fabricação e manutenção de dispositivos médicos.

Os biossensores eletroquímicos são dispositivos bioeletrônicos que consistem em um elemento de reconhecimento biológico, além de um sistema transdutor capaz de converter o evento bioquímico em um parâmetro elétrico detectável. Enzimas, DNA, RNA, células, tecidos, antígenos/anticorpos, entre outras biomoléculas, podem atuar como elementos de biorechecimento (TURNER, 2013). Além do sistema eletroquímico, os transdutores podem ser baseados em métodos ópticos, piezoelétricos, acústicos e calorimétricos de detecção.

Com o uso dessas ferramentas bioanalíticas, pode-se avaliar rapidamente o estado de saúde dos pacientes, além do estágio da infecção e sua progressão, o que permite o planejamento do tratamento de muitas doenças com o auxílio da combinação multidisciplinar de tópicos em bioquímica, ciências médicas e nanotecnologia. Esses dispositivos são relativamente econômicos, altamente sensíveis, seletivos, fornecem repostas rápidas, são fáceis de manusear e podem ser produzidos em escala industrial para uso humano.

A aplicação médica dos dispositivos bioeletrônicos aliada à análise estatística dos resultados permite o desenvolvimento de uma metodologia completa que abrange desde a coleta, preparo e ensaio da amostra, até o processamento e interpretação do diagnóstico. Ferramentas de tratamento multivariado como a Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (AD-MQP), são comumente utilizadas para fins de classificação e predição de amostras em estudos de análise clínica (BRERETON; LLOYD, 2014). De modo semelhante, a análise ROC (do inglês, *Receiver Operating Characteristic*) é uma ferramenta poderosa para mensurar e especificar problemas no desempenho do diagnóstico em medicina. Este estudo por meio de um método gráfico simples e robusto, permite estudar a variação da

sensibilidade e especificidade de determinado método para diagnóstico (OBUCHOWSKI; BULLEN, 2018).

No âmbito de diagnóstico clínico, a Organização Mundial da Saúde destaca a existência de dezessete doenças tropicais negligenciadas e sem diagnóstico amplo, incluindo a *estrongiloidíase* (“WHO | Strongyloidiasis”, 2016). Trata-se de uma doença parasitária intestinal, frequentemente assintomática, o que dificulta o monitoramento da abrangência da infecção na população (CORRAL et al., 2017). No Brasil, a distribuição da doença é variável, em função de parâmetros determinantes, como localização geográfica, além de disparidades socioeconômicas e sanitárias.

Neste contexto, o desenvolvimento de biossensores aplicados na análise clínica atraiu interesse científico/comercial considerável nos últimos anos, devido a necessidade de criação de dispositivos de testes manuais rápidos e simples. O principal objetivo desses dispositivos eletroanalíticos é melhorar a triagem dos pacientes, fornecendo resultados seguros, confiáveis e de baixo custo para diagnóstico rápido e amplo, abrangendo, inclusive, a população de baixa renda.

1.2 BIOSENSORES ELETROQUÍMICOS

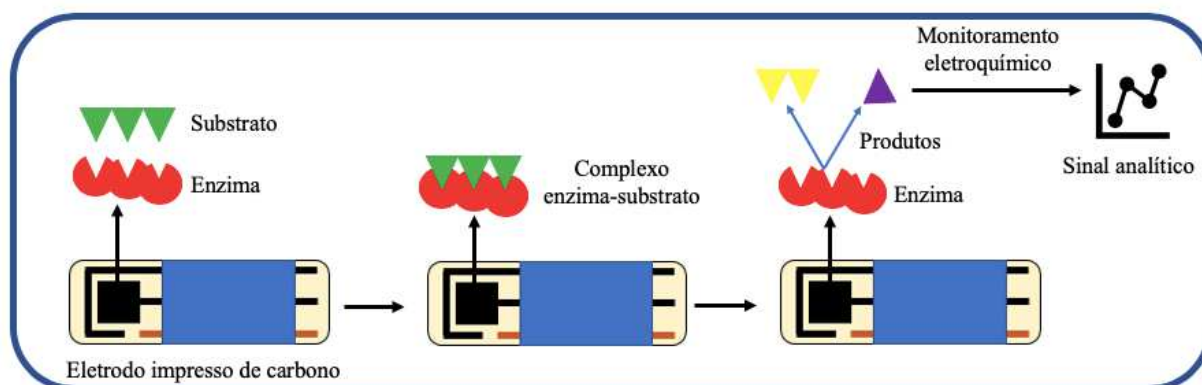
Plataformas de biossensoriamento, conforme abordado anteriormente, são dispositivos analíticos que convertem uma resposta bioquímica em um sinal de domínio elétrico detectável, incluindo carga, diferença de potencial, resistência, capacitância, impedância e corrente elétrica (AMADOR SALOMÃO, 2018). Tipicamente, os biossensores são extremamente seletivos e/ou específicos, robustos, e reutilizáveis quando operados sob condições brandas de pH e temperatura (CALIL; ROBERTO, 2011).

A abordagem prática para projetar um biossensor eletroquímico envolve um eletrodo base, materiais modificadores que compõem o sistema de transdução e a imobilização do material biológico neste suporte, oferecendo uma engenharia de pesquisa multidisciplinar em química, física e biologia (VICENTINI, 2013). Os biossensores podem ser divididos em duas categorias principais, com base no método de captura e detecção dos compostos alvo: (1) biossensores baseados em catalisadores e (2) biossensores baseados em afinidade (FATIBELLO-FILHO; CAPELATO, 1992).

O mecanismo de funcionamento dos biossensores baseados em catalisadores é governado principalmente por uma reação catalítica na superfície do dispositivo, em função da atividade de enzimas, microorganismos ou tecidos, na presença de uma molécula alvo eletricamente ativa (SASSOLAS; BLUM; LECA-BOUVIER, 2012). O consumo contínuo da molécula alvo nessa reação resulta em uma resposta transitória ou em um estado estacionário que podem ser monitorados por um analisador eletroquímico.

As enzimas, os receptores mais comuns nos biossensores catalíticos, ligam-se ao composto alvo através de sítios ativos para originar um complexo que eventualmente converte a molécula alvo no(s) produto(s) final, conforme esquema da Figura 1. Posteriormente, o transdutor eletroquímico monitora o consumo da molécula alvo durante a conversão, e/ou o produto final. Esses biocatalisadores naturais são selecionados com base em seu alto nível de seletividade/especificidade para detecção direta do composto alvo. Por exemplo, eletrodos modificados com glicose oxidase são utilizados no monitoramento de glicose (WANG *et al.*, 2013), colesterol oxidase empregada na determinação de colesterol (UMAR *et al.*, 2014), acetilcolinesterase para acetilcolina (JANEGITZ, 2012), tirosinase para bisfenol (KURBANOGLU *et al.*, 2017) e lacases para o monitoramento de compostos (poli)fenólicos gerais (COELHO *et al.*, 2019; MATTOS *et al.*, 2019; GOMES *et al.*, 2020).

Figura 1. Esquema de uma reação enzimática em um biossensor eletroquímico catalítico



Fonte: o próprio autor

Biossensores de afinidade são baseados em relações que reproduzem um evento biológico natural, utilizando as interações dos compostos alvo com um elemento de bioreconhecimento, como proteínas, DNAs sintéticos ou aptâmeros. A interação resultante será monitorada e resultará em um sinal através da ligação a um transdutor (LIU et al., 2016). Antígenos (Ag) e anticorpos (Ac) são os receptores mais comumente usados, destinados a construção de imunossensores eletroquímicos, contribuindo em várias aplicações de detecção, incluindo diagnóstico de câncer, doenças infecciosas e não infecciosas (CHEN *et al.*, 2019).

1.2.1 Imunossensores Eletroquímicos

Anticorpos são proteínas produzidas pelo sistema imunológico, que contêm sítios estruturais para o reconhecimento de antígenos, os quais se ligam a essas estruturas polipeptídicas a partir de padrões específicos e por interações não covalentes com afinidade relativamente alta (LIN; JU, 2005). A interação anticorpo-antígeno é o fenômeno mais importante no mecanismo de funcionamento/monitoramento de dispositivos imunossensores.

Entre os diferentes tipos de imunossensores, os dispositivos eletroquímicos são específicos, sensíveis e podem oferecer análises em tempo real de vários alvos em uma plataforma automatizada (FARGHALY et al., 2014). Deste modo, diversos estudos recentes da literatura abordam a construção de imunossensores eletroquímicos para a detecção de dois importantes biomarcadores de câncer, como o antígeno carcinoembrionário (ACE) e o

antígeno prostático específico (APE) (CAO *et al.*, 2013; CHEN *et al.*, 2019; SONG *et al.*, 2020; YANG *et al.*, 2018; ZHOU *et al.*, 2014). O ACE é um marcador multitumoral para diagnóstico clínico de diferentes tipos de câncer, como tumores de cólon, mama, carcinoma do ovário, carcinoma gástrico, pancreático e pulmonar (PENG *et al.*, 2016). O APE, por outro lado, é um biomarcador específico apenas para a detecção do câncer de próstata (CHEN *et al.*, 2019).

Recentemente, alguns estudos da literatura descrevem o desenvolvimento de imunossensores eletroquímicos aplicados no diagnóstico de doenças que acometem especialmente regiões tropicais. Luna e colaboradores (2015) apresentam um imunossensor baseado em nanopartículas de ouro (NPsAu) e monocamadas automontadas de cisteína para a detecção do vírus da dengue (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4). Kaushik e colaboradores (2018) descrevem um imunossensor para detecção de proteínas do vírus Zika (ZIKV) usando um microeletrodo interdigitado de ouro (μ EID-Au). Ambos utilizam técnicas voltamétricas e impedimétricas para monitorar a resposta bioquímica de cada sorotipo de dengue e Zika em diferentes diluições.

Eletrodos modificados para aplicação em imunossensoriamento também são descritos na literatura para diagnóstico clínico de toxoplasmose. Recentemente, Takara e colaboradores (2019) desenvolveram um eletrodo impresso de carbono (EIC) modificado com álcool polivinílico (APV), polivinilpirrolidona (PVP) e óxido de grafeno (OG), aplicado na determinação de anticorpos IgG anti *T. gondii* para diagnóstico sorológico da doença. Leishmaniose, Doença de Chagas, Malária, entre outras doenças tropicais, também podem ser diagnosticadas e monitoradas utilizando dispositivos previamente descritos na literatura (VINICIUS FOGUEL *et al.*, 2011; HEMBEN; ASHLEY; TOTHILL, 2017; MARTINS *et al.*, 2020). Entretanto, não há registros na literatura científica que descrevam um imunossensor eletroquímico para diagnóstico rápido e monitoramento de estroglioidíase, evidenciando o destaque e a exclusividade deste trabalho.

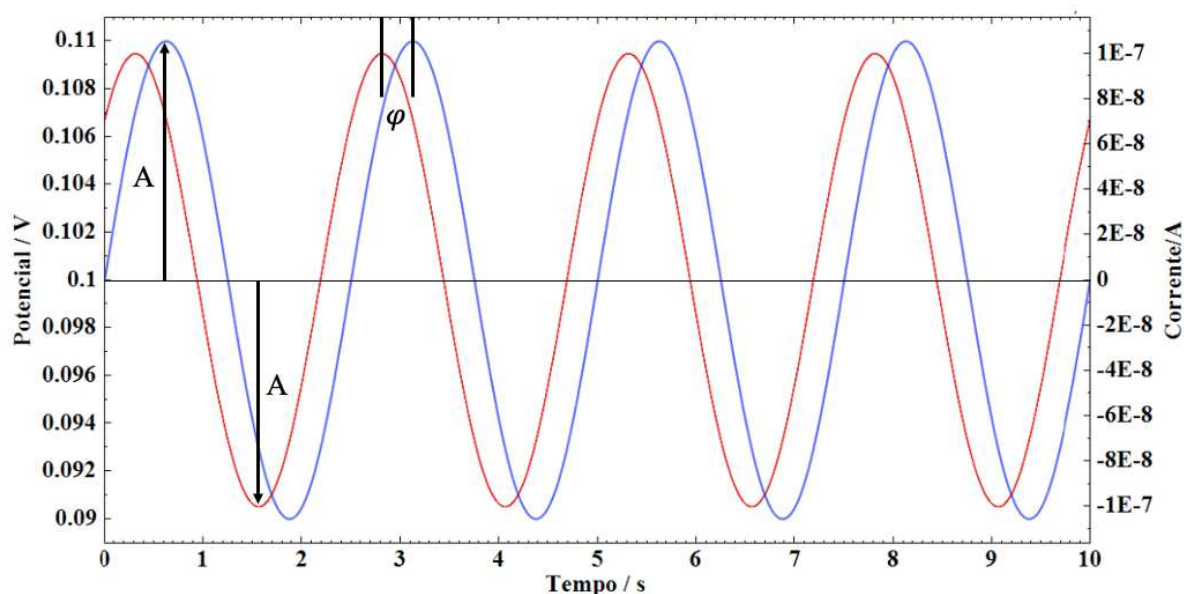
1.2.2 Imunossensores Impedimétricos/Voltamétricos

Entre os diferentes tipos de imunossensores que permitem o monitoramento (in)direto das interações antígeno-anticorpo, os imunossensores impedimétricos receberam recentemente uma atenção especial, pois possuem várias características atraentes associadas ao uso de transdutores eletroquímicos, como baixo custo de produção de eletrodos em escala industrial, capacidade de miniaturização e integração com ferramentas de diagnóstico controladas por múltiplos ou microprocessadores, além do controle remoto de sensores implantados ou vestíveis (PRODRONIDIS, 2010). Deste modo, considerando as características acima mencionadas, os dispositivos eletroanalíticos baseados em espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) são considerados candidatos promissores para aplicações no diagnóstico clínico.

Desde os trabalhos pioneiros Bataillard e colaboradores (1988) sobre o conceito de imunossensores capacitivos ou impedimétricos, importantes avanços ocorreram nessa área específica. Durante os últimos anos, a espectroscopia de impedância eletroquímica tem sido amplamente utilizada na investigação de vários tipos de interações biomoleculares, como, por exemplo, hibridação de DNA, triagem biomolecular rápida e monitoramento de cultura de células (BERGGREN; BJARNASON; JOHANSSON, 2001; DANIELS; POURMAND, 2007). Devido às inúmeras vantagens inerentes, os imunossensores impedimétricos poderiam ser potencialmente utilizados para fins qualitativos, como detecção de bactérias, testes de gravidez, testes de triagem de alergias, além do diagnóstico de doenças infecciosas e não infecciosas.

A EIE é uma técnica de corrente alternada (CA) que descreve a resposta de corrente de uma célula eletroquímica a um sinal de tensão senoidal de pequena amplitude (A) em função do tempo, conforme representado no gráfico da Figura 2. A onda senoidal de corrente resultante difere no tempo (mudança de fase, φ) em relação à onda perturbadora (V , tensão), e a razão $V(t)/I(t)$ (I , corrente) é definida como a impedância (Z), que é resultado da contribuição de todos os componentes dentro da célula eletroquímica (resistores, capacitores e indutores) em resposta ao fluxo de elétrons e íons (FUNG; WONG, 2001).

Figura 2. Função senoidal da variação de corrente e potencial em função do tempo para monitoramento de impedância eletroquímica



Fonte: o próprio autor

Em uma célula eletroquímica, a cinética de eletrodos, reações redox, fenômenos de difusão e interações moleculares na superfície do eletrodo podem ser consideradas análogas aos componentes acima mencionados que impedem o fluxo de elétrons em um circuito CA (BERGER; GREVE, 2000). A impedância é expressa como um número complexo, onde a resistência ôhmica é o componente real e a reatância capacitiva é o imaginário (LVOVICH; WILEY INTERSCIENCE (ONLINE SERVICE), 2012). O formato mais popular para avaliar dados de impedância eletroquímica é a representação gráfica de Nyquist, no qual o componente de impedância imaginária (Z'' , fora de fase) é plotado contra o componente de impedância real (Z' , em fase) em cada frequência de excitação (PEJCIC; DE MARCO, 2006).

Imunossensores impedimétricos exploram alterações nas propriedades dielétricas e/ou na espessura da camada dielétrica nas interfaces eletrólito-eletrodo, devido à interação anticorpo-antígeno (Ac-Ag), para monitorar esse processo bioquímico. Um capacitor eletrolítico (no sistema eletrodo de trabalho/dielétrico/eletrolito) permite a detecção de uma espécie alvo específica que interage com o receptor que foi imobilizado na camada dielétrica, a qual é previamente depositada na superfície do eletrodo de trabalho, conforme Figura 3(I) (BERGGREN; BJARNASON; JOHANSSON, 2001). Idealmente, essa

configuração se assemelha a um capacitor em sua capacidade de armazenar carga e, portanto, a capacitância elétrica entre o eletrodo de trabalho e o eletrólito é dada pela Equação 1 abaixo:

$$C = \frac{\epsilon_0 \epsilon A}{d} \quad \text{Equação 1}$$

na qual ϵ representa a constante dielétrica do meio entre as placas, ϵ_0 é a permissividade no vácuo ($8,85419 \text{ pF m}^{-1}$), A é a área da superfície das placas (m^2), e d é a distância entre as placas (m) (GUAN; MIAO; ZHANG, 2004).

Nas plataformas de imunossensoriamento espera-se uma diminuição da capacitância total, devido ao aumento da distância entre as placas, após a ligação do composto alvo ao seu bioreceptor específico. Esse fenômeno pode ser representado por dois capacitores em série, o interno correspondendo à camada dielétrica (C_{dl}), o externo corresponde à camada de biomoléculas (C_{bm}) e, conseqüentemente, às interações dessa camada com seu ligante específico (PRODROMIDIS, 2010). Como a corrente deve passar através da resistência descompensada da solução eletrolítica, essa resistência é inserida como um elemento em série no circuito, conforme apresentado na Figura 3(II). Nessas condições, a capacitância total C_t pode ser descrita pela Equação 2 apresentada abaixo:

$$\frac{1}{C_t} = \frac{1}{C_{dl}} + \frac{1}{C_{bm}} \quad \text{Equação 2}$$

As alterações que geram sinais detectáveis nos imunossensores são induzidas por alterações nas propriedades dielétricas, distribuição de carga ou mesmo alterações conformacionais da camada de biomoléculas imobilizadas após sua interação com o composto alvo, conforme discutido anteriormente. Comumente, os capacitores eletroquímicos mencionados acima são descritos como CPE (do inglês, *constant phase element*). Matematicamente, $CPE = (1/Q)^{-1}(j\omega)^{-n}$, onde Q é a carga e $j = (-1)^{1/2}$, sendo um elemento elétrico mais generalizado (BRETT; BRETT, 1993). Embora a base física exata do CPE precise ser elucidada, este elemento pode servir como uma ferramenta muito flexível para ajustar dados experimentais. Na prática, a presença de CPE em vez de C_t significa que a capacitância observada do sistema depende da frequência.

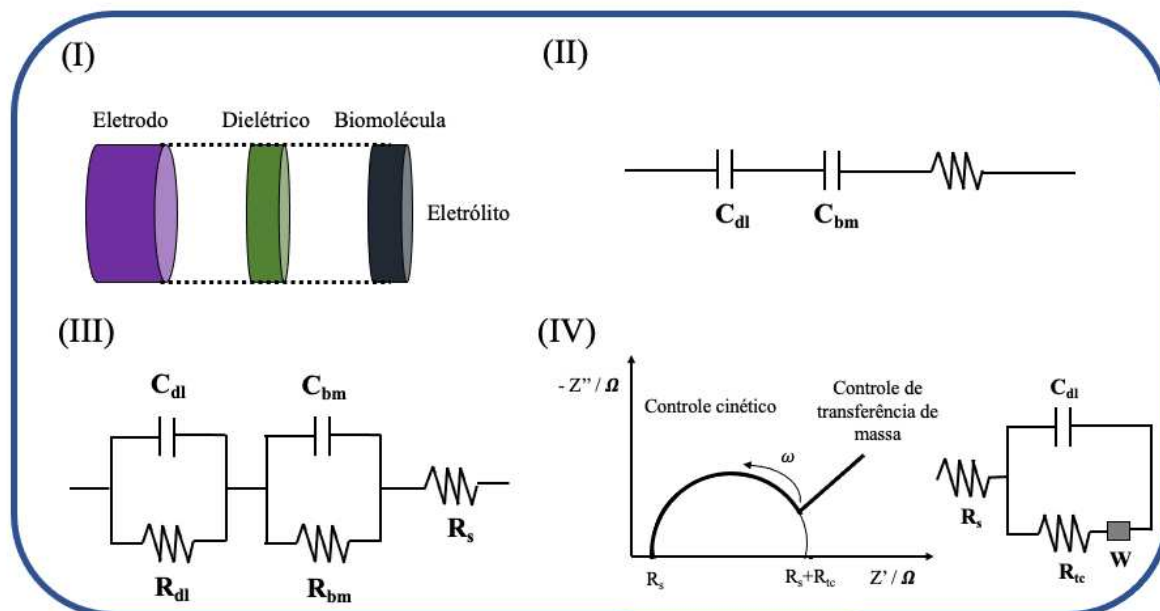
O comportamento dielétrico não ideal das camadas isolante e de biomoléculas pode ser representado por uma resistência como um elemento paralelo a cada um dos capacitores correspondentes, conforme representação na Figura 3(III). Defeitos na

construção da camada isolante (orifícios) e a existência de íons e moléculas de água na estrutura da proteína são as principais razões para o comportamento dielétrico não ideal de um conjunto testado. Embora nenhum modelo equivalente possa ser garantido como único, a simulação dos dados impedimétricos registrados em um circuito elétrico equivalente é uma estratégia comum para entender a origem física da resposta observada (PRODRONIDIS, 2010).

O circuito equivalente mais simples e utilizado com mais frequência para modelagem dos dados experimentais da EIE é o circuito de Randles (Figura 2(IV)), que compreende a resistência não compensada da solução (eletrólito) (R_s), em série com a capacitância do dielétrico (C_{dl}) e a resistência à transferência de carga (R_{tc}), se houver uma espécie eletroativa atuando como sonda na célula eletroquímica. Os dois últimos componentes estão conectados em paralelo. Um componente adicional, conectado em série a R_{tc} , a impedância de Warburg (Z_w), é responsável pela difusão de íons do eletrólito para a interface do eletrodo. Uma forma típica do espectro de impedância deste circuito é apresentada em um gráfico de Nyquist (também na Figura 3(IV)), o qual inclui uma região semicircular situada no eixo real, seguida por uma linha reta. A parte linear ($\varphi = \pi/4$), observada no intervalo de baixa frequência, implica um processo limitado de transferência de massa (GUAN; MIAO; ZHANG, 2004), enquanto o semicírculo, observado na faixa de alta frequência, implica um processo limitado de transferência de carga.

A componente R_{tc} , correspondente a resistência à transferência de carga de processos redox de uma sonda eletroativa presente no meio, é um parâmetro altamente sensível que é afetado pela interação antígeno-anticorpo. O aumento da camada de biomoléculas (material biológico não condutor) no sistema descrito acima resulta em bloqueios parciais dos sítios eletroativos, levando a um aumento na resistência (R_{tc}) e, conseqüentemente, a diminuição na taxa de transferência eletrônica na interface eletrodo/solução. Deste modo, a partir dos gráficos de Nyquist, é possível monitorar alterações no valor de R_{tc} em função da análise de amostras sorológicas de pacientes infectados (contendo Ac) e não-infectados (ausência de Ac).

Figura 3. (I) Representação de um biossensor capacitivo/impedimétrico; (II) e (III) Circuitos elétricos para representar (IV) Gráfico de Nyquist do circuito de Randles (mostrado no painel lateral)

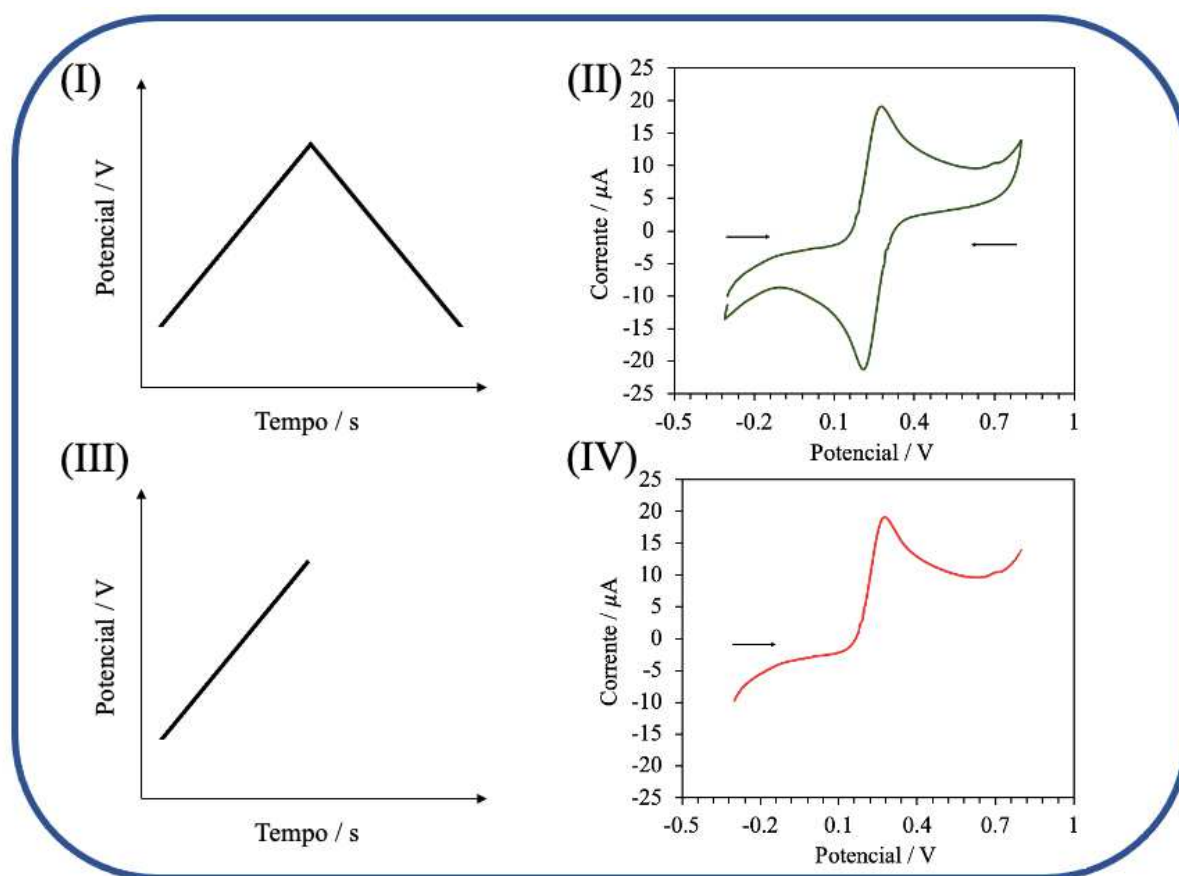


Fonte: o próprio autor

Os imunossensores eletroquímicos baseados em voltametria cíclica (VC) ou linear (VL) são ainda mais promissores tendo em vista que podem fornecer respostas rápidas utilizando dispositivos portáteis de menor custo em relação aos equipamentos com módulo de impedância. Em um experimento de VC típico, o potencial do eletrodo de trabalho aumenta linearmente em relação ao tempo em fases cíclicas, conforme Figura 4(I). A taxa de variação da tensão ao longo do tempo durante cada um desses ciclos é um parâmetro instrumental e é conhecido como velocidade ou taxa de varredura, dada em volts por segundo. O potencial aplicado no eletrodo de trabalho é baseado no eletrodo de referência, enquanto a corrente de redução ou oxidação da espécie eletroativa é monitorada entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo auxiliar (GROSSER, 1994). Esses dados são plotados como corrente (I) versus potencial aplicado (E) e as curvas resultantes são chamadas de voltamogramas cíclicos (Figura 4(II)). Em um experimento de voltametria de varredura linear, o potencial do eletrodo de trabalho também varia linearmente no tempo. Ao contrário das medições de VC, depois que o potencial definido é alcançado, o potencial do eletrodo de trabalho não sofre uma variação na direção oposta para retornar ao potencial inicial, conforme apresentado na Figura

4(III). O processo redox de espécies químicas presentes na interface eletrodo/solução é registrado como um pico (oxidação) ou vale (redução) no sinal de corrente no potencial em que a espécie eletroativa começa a ser oxidada ou reduzida, como representado no voltamograma linear da Figura 4(IV) (DAVIES; COMPTON, 2005).

Figura 4. Curva de Potencial vs. Tempo para (I) voltametria cíclica e (III) voltametria linear; representação de um voltamograma (II) cíclico e (IV) linear



Fonte: o próprio autor

Estudos previamente reportados na literatura relatam uma diminuição na intensidade do pico redox correspondente a sonda eletroquímica utilizada após a formação do complexo antígeno-anticorpo nos eletrodos devido à sua atividade não eletroativa, que bloqueia parcial ou totalmente a transferência de elétrons entre o eletrodo de trabalho e a espécie eletroquímica. O sistema iônico ferri/ferrocianeto ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$) geralmente funciona como sonda de sinal eletroquímico em dispositivos imunossensores devido à sua

biocompatibilidade e alta capacidade de troca eletrônica (GUAN; MIAO; ZHANG, 2004; LAYQAH; EISSA, 2019).

1.2.3 Eletrodo Impresso de Carbono

A tecnologia de eletrodos impressos (EIs) consiste em deposições camada por camada (do inglês, *layer-by-layer*) de tintas condutoras sobre um substrato sólido, através do uso de uma tela ou malha, definindo a geometria do sensor (CINTI et al., 2015). Essa tecnologia possui vantagens de flexibilidade de *design*, automação de processos, boa reprodutibilidade, e uma ampla variedade de materiais podem ser utilizados na fabricação desses dispositivos. Os EIs geralmente incluem uma configuração de três eletrodos (eletrodos de trabalho, auxiliar e referência) impressos em vários tipos de substratos de plástico ou cerâmica, que são facilmente modificáveis com uma grande variedade de tintas comerciais ou sintetizadas em laboratório. Durante o processo de fabricação dos EIs, os eletrodos de trabalho são impressos principalmente usando tintas a base de carbono (SRIPRACHUABWONG et al., 2012).

Eletrodos impressos de carbono, caracterizados pela fabricação de baixo custo e produção em larga escala, têm atraído um interesse crescente para aplicações no desenvolvimento de imunossensores eletroquímicos. Devido às dimensões miniaturizadas dos EICs, todas as etapas do ensaio imunológico podem ser realizadas utilizando volumes de uma gota, apenas alguns microlitros de solução, reduzindo significativamente o consumo de reagentes. Além disso, a diminuição das distâncias de difusão exigidas para que a molécula alvo alcance seus bioreceptores ligados à superfície, permite períodos mais curtos de incubação e, conseqüentemente, ensaios e diagnósticos mais rápidos.

Taleat e colaboradores (2013) relataram a construção de um imunossensor impedimétrico para a detecção do antígeno de câncer 125 (CA 125), uma proteína associada ao câncer epitelial de ovário. Uma monocamada automontada foi formada na superfície de nanopartículas de ouro eletrodepositadas em um EIC usando um composto tiol (ácido 11-mercaptopundecanóico), cujos grupos carboxílicos foram acoplados a grupos amino do anticorpo anti-CA 125 via reação com os agentes de ligação 3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida/N hidroxisuccinimida (EDC/NHS). Cada etapa do imunossensor desenvolvido foi caracterizada com sucesso usando VC e EIE, empregando o

sistema $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ como sonda eletroquímica, evidenciando a aplicabilidade dos EICs na construção de plataformas para imunossensoriamento destinadas ao diagnóstico clínico.

1.2.4 Nanotecnologia no Sistema de Transdução

Os materiais com dimensões nanométricas apresentam excelentes propriedades ópticas, elétricas, catalíticas, além de elevada resistência mecânica, e são amplamente empregados na construção de diversos dispositivos bioeletrônicos (YU et al., 2014). Com o objetivo de melhorar as propriedades eletroanalíticas dos dispositivos impressos, modificações com uma variedade de nanomateriais de elevada condutividade e elementos de reconhecimento sintético têm sido exploradas com sucesso. O sistema transdutor de diversas plataformas para biossensoriamento é modificado com materiais carbonáceos, como nanotubos de carbono (NTCs) (GOODING, 2005), grafeno (G) (ARENAS et al., 2016) e *carbon black* (CB) (TALARICO et al., 2015), além de nanopartículas (NPs) metálicas (PENN; HE; NATAN, 2003) e *quantum dots* (QDs) (ZHANG et al., 2013). Essas entidades podem ter as mesmas dimensões dos elementos de reconhecimento biológico, como DNA e proteínas, de modo que a combinação desses materiais pode originar efeitos sinérgicos, resultando em benefícios analíticos extramente importantes, como seletividade e sensibilidade.

Nanoestruturas de óxido de zinco tem atraído muita atenção recentemente, em função de suas amplas aplicações em óptica, optoeletrônica e (bio)sensores (NESAKUMAR et al., 2016). A biocompatibilidade, baixa toxicidade, alta mobilidade de elétrons e simples processo de síntese do ZnO, são favoráveis à aplicação em dispositivos bioeletrônicos. Além disso, este material apresenta um alto ponto isoelétrico (PIE) de cerca de 9,5, o que o torna adequado para a adsorção de proteínas com PIEs baixos por meio de interações eletrostáticas. Atualmente, nanotubos e nanobastões de ZnO têm sido utilizados na construção de biossensores eletroquímicos (KUMAR; CHEN, 2008). No entanto, os *quantum dots* (pontos quânticos) de óxido de zinco, por apresentarem tamanho semelhante ao das biomoléculas, fornecem um ambiente interativo mais favorável para a ocorrência de processos bioquímicos.

Gu e colaboradores (2011) descrevem a construção de um imunossensor eletroquímico utilizando QDsZnO no sistema transdutor para detecção do antígeno CA 19-9,

associado ao câncer de pâncreas. Os autores destacam a performance excelente dos pontos quânticos de ZnO como matriz de imobilização eletrostática do anticorpo para CA 19-9, o que garantiu alta sensibilidade, seletividade e estabilidade ao dispositivo construído. Entretanto, nanoestruturas de ZnO ainda não foram aplicadas na construção de imunossensores para teste rápido de estrogiloidíase, considerando que os QDs podem atuar como suportes eficientes para imobilização de antígenos ou anticorpos associados a essa doença.

1.3 MODELOS ESTATÍSTICOS APLICADOS AO IMUNOSSENSORIAMENTO

A análise discriminante por mínimos quadrados parciais é um algoritmo versátil que pode ser usado para modelagem preditiva e descritiva, bem como para seleção de variável discriminativa (NESPECA et al., 2018), conforme discutido anteriormente. O algoritmo de MQP foi introduzido pela primeira vez para as operações de regressão e depois evoluiu para um método de classificação, conhecido como análise discriminante MQP. Na prática, a AD-MQP combina redução de dimensionalidade e análise discriminante em um algoritmo e é especialmente aplicável à modelagem de dados de alta dimensão. Além disso, a AD-MQP não assume que os dados se ajustam a uma distribuição particular e, portanto, é mais flexível do que outros algoritmos discriminantes (LEE; LIONG; JEMAIN, 2018). Conseqüentemente, a modelagem por AD-MQP tem uma infinidade de aplicações que abrangem diversos campos, incluindo análise de alimentos (NUNES et al., 2019) e diagnósticos clínicos (CAO et al., 2011; JIANG et al., 2011; WANG et al., 2012). Teoricamente, é uma técnica de análise multivariada de dados utilizada para relacionar uma ou mais variáveis de resposta (Y) com diversas variáveis independentes (X), com base no uso de fatores. Usando como exemplo a análise de dados clínicos fornecidos por um imunossensor voltamétrico, a matriz X seria formada por valores de corrente em diferentes potenciais e Y é formada por variáveis binárias fictícias que indicam a classe à qual cada amostra pertence.

A curva ROC é uma ferramenta visual para avaliar a precisão de um método de diagnóstico classificador, como a resposta voltamétrica/impedimétrica de um imunossensor eletroquímico, por exemplo. Como medida e exibição da precisão da classificação, a curva ROC tem vários recursos atraentes em relação a outras medidas

concorrentes. Algumas dessas características desejáveis incluem a incorporação de sensibilidade (isto é, fração verdadeiro-positivo) e especificidade (isto é, fração verdadeiro-negativa) em uma única métrica de desempenho (OBUCHOWSKI; BULLEN, 2018). Uma etapa fundamental na validação de um método é o estabelecimento de sua sensibilidade e especificidade. Neste contexto, sensibilidade refere-se ao valor mais baixo de um parâmetro experimental que o método analítico pode diferenciar de forma confiável, enquanto especificidade se refere à capacidade do ensaio de distinguir parâmetros para diferentes grupos de amostras. De modo simplista, as curvas ROC na regressão logística são usadas para determinar o melhor valor de corte para prever se uma nova observação pertence ao grupo de infectados ou não infectados, no contexto de diagnóstico clínico para determinada doença, considerando sensibilidade e especificidade (OBUCHOWSKI; BULLEN, 2018).

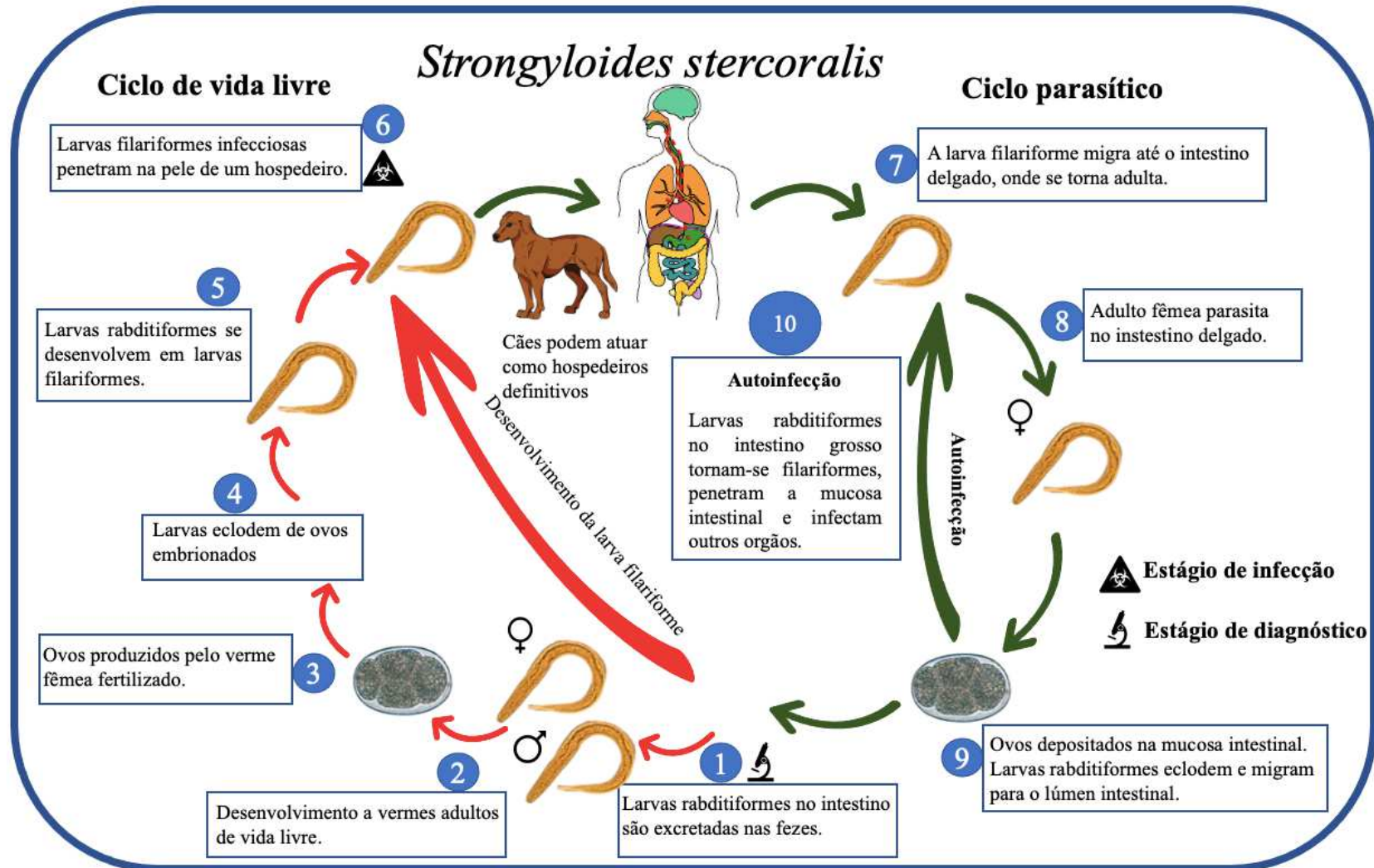
1.4 ESTRONGILOIDÍASE

1.4.1 Ciclo Biológico e Sintomas

A Estrongiloidíase (estr.) ou Estrongiloidose é uma infecção intestinal causada pelo parasita nemátode *Strongyloides stercoralis*, o qual pode viver indefinidamente no solo de forma livre, e apenas as fêmeas podem ser parasitas no organismo animal (OLSEN et al., 2009). A Figura 5 apresenta o ciclo biológico do *S. stercoralis*, o qual se inicia com a deposição de larvas rabditiformes no ambiente através da excreção nas fezes de um organismo contaminado (etapa 1). Essas larvas se desenvolvem em formas adultas femininas de vida livre, alimentando-se de detritos orgânicos no solo (etapa 2). Na forma livre, as fêmeas podem acasalar com machos (sempre de vida livre) produzindo sexualmente ovos que se desenvolvem em larvas, geneticamente diversas (etapas 3, 4 e 5). A infecção por larvas fêmeas ocorre através de penetração direta (rápida e indolor) na pele intacta, principalmente a partir dos membros inferiores (etapa 6, pés descalços em solo contaminado, por exemplo). Após penetração em um organismo humano, a larva atinge o sistema gastrointestinal através da corrente sanguínea. No intestino, a forma adulta se desenvolve (etapas 7 e 8), produzindo ovos clones fêmeas por reprodução assexuada (etapa 9, partenogênese). Ainda neste ciclo, em casos mais graves, pode ocorrer o processo de autoinfecção, no qual as larvas podem penetrar a mucosa intestinal e atingir outros órgãos (etapa 10) (REQUENA-MÉNDEZ et al., 2013).

O período de incubação é de duas a três semanas, até que os primeiros sintomas são observados. Na fase intestinal, muitos pacientes contaminados são assintomáticos, mas pode haver dor abdominal e diarreia e, em casos mais graves, necrose e edema, resultando em má absorção de nutrientes. O agravante desta parasitose é o processo de autoinfecção, devido a multiplicação e constante invasão das larvas em diferentes órgãos, podendo causar danos severos no pulmão, fígado e canais biliares, principalmente em pacientes com sistema imunológico deficiente (OLSEN et al., 2009).

Figura 5. Ciclo biológico do *Strongyloides stercoralis*, causador da estrogiloidíase



Fonte: o próprio autor

1.4.2 Diagnóstico Clínico

A estrogiloidíase é geralmente diagnosticada pela identificação microscópica das larvas de *Strongyloides stercoralis* (rabditiforme e ocasionalmente filariforme) nas fezes e/ou líquido duodenal. Este método, no entanto, nem sempre é eficiente, fornecendo falsos negativos devido a carga de infecção geralmente baixa em casos menos graves, nos quais a produção larval é mínima e o exame microscópico das fezes apresenta baixa sensibilidade, sendo necessárias de três a sete amostras para garantir um nível de confiabilidade elevado (DREYER et al., 1996).

Os testes imunológicos para estrogiloidíase são indicados quando há suspeita de infecção e o parasita não é detectado por exames repetidos de fezes. A maioria dos testes de detecção de anticorpos emprega antígenos derivados de larvas filariformes de *Strongyloides stercoralis*. Embora os testes de anticorpos por fluorescência indireta (FI) (DAFALLA, 1972) e hemaglutinação indireta (HI) (SATO et al., 1991) estejam disponíveis, o imunoenensaio enzimático (IEE) é recomendado devido à sua maior sensibilidade. O teste ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) é uma técnica de ensaio em placa, projetado para detectar e quantificar peptídeos, proteínas, anticorpos e hormônios (GENTA, 1988). Neste método, um antígeno deve ser imobilizado em uma superfície sólida e depois complexado com um anticorpo que está vinculado a uma enzima. O resultado dessa interação é então monitorado utilizando métodos espectrofotométricos e/ou colorimétricos.

No entanto, o teste ELISA é uma abordagem óptica e, como tal, pode sofrer com as desvantagens associadas a esse tipo de método de detecção. Essas restrições estão relacionadas a possíveis sinais falsos (resultantes de amostras coloridas), tamanho da amostra, tempo de análise bastante longo e dificuldade de uso fora do laboratório de diagnóstico clássico. Nesse contexto, os imunossensores eletroquímicos aparecem como a alternativa mais promissora em relação a abordagem óptica para detecção de espécies clinicamente importantes. Esses dispositivos são ferramentas analíticas alternativas com níveis de sensibilidade, especificidade e confiabilidade comparáveis. Além disso, apresentam custo mais baixo, possibilidade de portabilidade, tempo de análise significativamente reduzido (< 10 minutos), e as imunorreações ocorrem na superfície do detector, permitindo monitoramento em tempo real.

No caso da estrogiloidíase, os níveis de anticorpos diminuem acentuadamente dentro de seis meses após o sucesso da quimioterapia (VAN DOORN et al., 2007). Deste modo, o monitoramento sorológico contínuo pode ser útil no acompanhamento dos pacientes tratados. Conforme abordado anteriormente, não existem dispositivos eletroquímicos descritos na literatura para diagnóstico imunológico da estrogiloidíase, o que garante a exclusividade e importância deste trabalho.

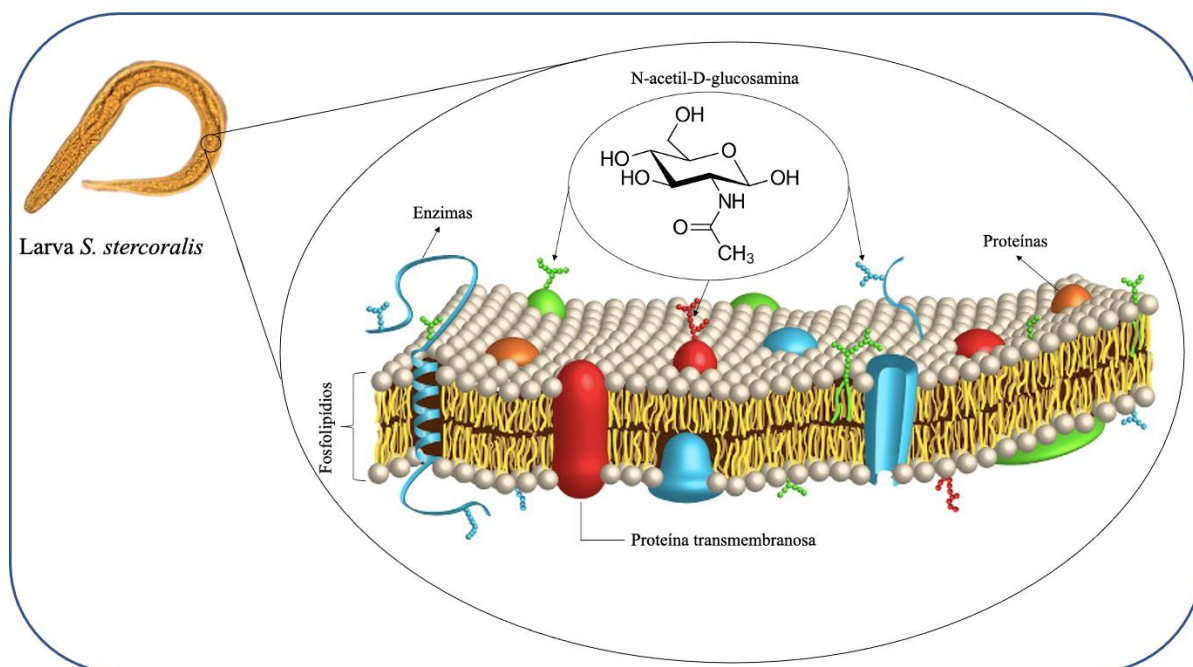
1.4.3 Extratos antigênicos de estrogiloidíase

Em imunologia, um antígeno é uma molécula, ou estrutura molecular, presente na parte externa de um patógeno, que pode ser ligado a um anticorpo específico ou receptor de antígeno das células de defesa do organismo humano. A presença de antígenos no corpo normalmente desencadeia uma resposta imune, resultando na formação do complexo antígeno-anticorpo. Cada anticorpo é produzido especificamente pelo sistema imunológico para corresponder a um antígeno depois que as células entram em contato com ele, permitindo uma identificação precisa e o início de uma resposta adaptativa. Durante a formação do imunocomplexo, diz-se que o anticorpo se "combina" com o antígeno no sentido de que pode se ligar a ele devido a uma adaptação em um fragmento de sua estrutura, denominado parátipo, que interage diretamente com o epítipo do antígeno (BIRD; ZUCKERMAN, 1989; MARSHALL et al., 2018).

Em termos de estrutura química, os antígenos são proteínas, peptídeos (cadeias de aminoácidos), polissacarídeos (cadeias de monossacarídeos / açúcares simples), ou ainda lipídeos e ácidos nucleicos, quando esses últimos estão combinados com proteínas e polissacarídeos. No caso de nematoides como o *S. stercoralis*, causador da estrogiloidíase, as larvas são revestidas com um carboidrato contendo resíduos de N-acetil-D-glucosamina (Figura 6) e, de acordo com a literatura, este composto é responsável por induzir a resposta imunológica a partir da produção de anticorpos pelo hospedeiro. A obtenção de um extrato total somático solúvel das larvas envolve um procedimento experimental complexo, envolvendo diversas etapas de inativação, separação e preparo do extrato antigênico total (BIRD; ZUCKERMAN, 1989; CORRAL et al., 2015).

A superfície mais externa da cutícula dos nematoides consiste em um glicocálice polianiónico recobrendo uma camada trilamelada, a qual contém a N-acetil-D-glucosamina, constituindo o complexo da epicutícula, conforme apresentado na Figura 6. A carga superficial líquida da epicutícula é negativa, de modo que é possível realizar-se a extração seletiva dessa estrutura utilizando surfactantes catiônicos como o brometo de cetiltrimetilamônio, por exemplo (PRITCHARD et al., 1985). Este processo de obtenção do estrato antigênico é bastante atrativo, pois consiste em um processo significativamente mais simples de incubação das larvas com o surfactante, e a cutícula resultante expressa moléculas que são altamente imunogênicas para o hospedeiro parasitado. Deste modo, os antígenos de superfície podem ser relevantes para a construção de dispositivos imunossensores, especialmente neste caso, considerando a estrutura fundamental do nematoide de interesse, *Strongyloides stercoralis*.

Figura 6. Representação da estrutura superficial da cutícula de uma larva de *Strongyloides stercoralis*



Fonte: o próprio autor

2 OBJETIVOS

Este projeto de mestrado teve como objetivo desenvolver um imunossensor eletroquímico voltamétrico/impedimétrico, através da imobilização eletrostática do antígeno de *S. stercoralis* em um eletrodo impresso de carbono modificado com compósito de grafeno e *quantum dots* de óxido de zinco, aplicado no diagnóstico clínico de estrogiloidíase empregando espectroscopia de impedância eletroquímica e voltametria cíclica/linear.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Preparar uma dispersão de grafeno utilizando carboximetil-botriosferana como polímero estabilizador.

Sintetizar *quantum dots* de óxido de zinco e utilizá-los como modificadores da dispersão de grafeno, constituindo um material compósito.

Realizar a caracterização físico-química/estrutural deste compósito utilizando técnicas eletroquímicas e espectroscópicas.

Modificar um eletrodo impresso de carbono com o compósito G/QDsZnO.

Imobilizar antígenos de *S. stercoralis* na superfície do EIC a partir de interação eletrostática com os QDsZnO.

Otimizar as variáveis do processo de construção do dispositivo, como concentração dos componentes do compósito e concentração de antígenos imobilizados.

Avaliar e otimizar parâmetros instrumentais da espectroscopia de impedância eletroquímica e voltametria cíclica/linear.

Determinar a especificidade do dispositivo projetado.

Aplicar o imunossensor proposto na análise imunológica de amostras reais de soro de pacientes que apresentem sintomas da estrogiloidíase, comparando os resultados com o teste imunológico padrão (ELISA).

Aplicar o modelo de AD-MQP para classificação das amostras como infectadas e não infectadas com base no voltamograma linear.

Aplicar curvas ROC para diagnóstico das amostras utilizando EIE.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

Apenas reagentes de grau analítico foram utilizados. Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura (resistividade $>18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$) obtida por meio do sistema Milli-Q (Millipore[®]).

A síntese dos QDsZnO e o preparo da dispersão de grafeno exigiram os seguintes reagentes: acetato de zinco diidratado ($\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $> 98\%$), metanol (CH_3OH , $99,8\%$), clorofórmio (CHCl_3 , $> 99\%$), hidróxido de potássio (KOH , $> 85\%$), grafite em pó ($> 99\%$), álcool 1-propanol ($\text{H}_3\text{C}(\text{CH}_2)_2\text{OH}$, $99,7\%$) (todos obtidos da Sigma Aldrich) e carboximetil botriosferana (CMB), a qual foi obtida por derivatização química do exopolissacarídeo produzido pelo fungo *Botryosphaeria rhodina*, conforme descrito previamente na literatura (BRANDI et al., 2011; DEKKER et al., 2019). A sonda eletroquímica ferri/ferrocianeto ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ e $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, $> 99\%$) de potássio foi obtida da Synth. Uma solução tampão Tris-HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,23) foi utilizada como eletrólito suporte nos experimentos voltamétricos e impedimétricos.

3.2 EQUIPAMENTOS

As medidas voltamétricas e impedimétricas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato/analizador de impedância modelo PalmSens 4 (PalmSens, *Compact Electrochemical Interfaces*, Holanda) controlado pelo software PSTrace 5.8, ao qual foi acoplado o dispositivo imunossensor EIC/G/QDsZnO/Ag(Es).

Os eletrodos impressos consistem em uma configuração de três eletrodos, sendo os eletrodos de trabalho e auxiliar baseados em carbono, e o eletrodo de referência a base de prata, impressos em substrato plástico flexível.

As medidas do pH foram realizadas com um pHmetro BEL-W3B (previamente calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 7,0), empregando um eletrodo combinado de vidro com um eletrodo de Ag/AgCl ($\text{KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$) como referência externa.

Para a caracterização dos QDsZnO, as medidas de Difração de Raios-X (DRX) foram realizadas no Laboratório de Difração de Raios X do LARX (Laboratório

Multiusuário da Pró Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação) da Universidade Estadual de Londrina (UEL), em um difratômetro PANalytical modelo X'Pert PRO MPD, com radiação $\text{CuK}\alpha$ (θ - 2θ). A tensão e a corrente usadas na fonte de radiação foram, respectivamente, 40 kV e 30 mA. O intervalo de varredura 2θ utilizado foi de 5 a 70 ° com passo angular de 0,04 °. O tempo de contagem por ponto foi de 6,0 s. As imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET) foram obtidas em um microscópio eletrônico de transmissão, modelo Fei Tecnai G2 (FEI, NY, EUA) operado a 80 kV. Imagens de ZnO isolado foram usadas para determinar o diâmetro médio das partículas. Os espectros de absorção molecular foram obtidos usando um espectrofotômetro Shimadzu UV-2600 UV-VIS (Pleasanton, CA, EUA), uma cubeta de quartzo para análise da amostra, com caminho óptico igual a 10 mm.

3.3 OBTENÇÃO DA DISPERSÃO DE GRAFENO

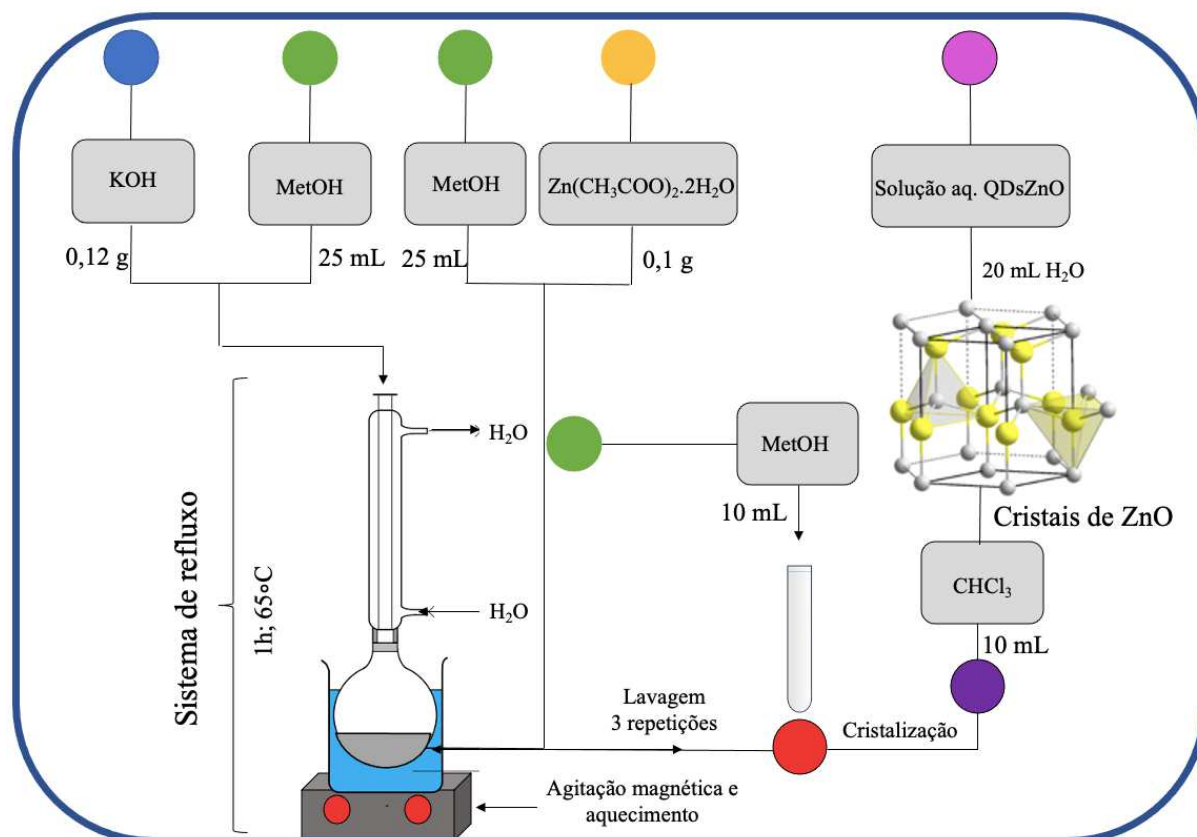
A dispersão de grafeno foi obtida conforme descrito por Sinar e Knopf (2018), com uma modificação; a carboximetil celulose foi substituída pela CMB, a qual foi utilizada para esfoliar e suspender folhas hidrofóbicas de grafeno em um solvente a base de água.

3.4 SÍNTESE DOS QUANTUM DOTS DE ZNO

A síntese dos QDsZnO envolve um simples processo de hidrólise e condensação do acetato de zinco e hidróxido de potássio em metanol, conforme o processo apresentado no fluxograma da Figura 7 e algumas modificações no procedimento descrito por Khorsand et al. (2011). Inicialmente, adicionou-se 0,1 g de $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a um balão de fundo redondo contendo 25 mL de metanol, aquecendo esse sistema a 65°C por 25 min, sob agitação magnética. Simultaneamente, adicionou-se 0,12 g de KOH a um erlenmeyer contendo 25 mL de metanol. Essa solução foi aquecida a 65 °C até solubilização total da base. Posteriormente, a solução contendo hidróxido de potássio foi adicionada gota a gota (intervalo de 10 a 15 min) a solução de acetato de zinco. A reação de síntese ocorreu em um sistema de refluxo, mantido a 65 °C e com agitação magnética. Após 1 hora, o mecanismo de aquecimento e agitação foi desligado, e o sistema deixado em repouso por 30 min. Então, extraiu-se o sobrenadante e o sólido sedimentado foi lavado com 10 mL de metanol (três

repetições), a fim de retirar-se qualquer espécie iônica presente no meio. Após a última lavagem, foram utilizados 10 mL de clorofórmio para promover a cristalização dos QDsZnO. Finalmente, após evaporação do clorofórmio, o sólido resultante foi reconstituído em 20 mL de água ultrapura.

Figura 7. Fluxograma ilustrando as etapas do processo de síntese dos QDsZnO



Fonte: o próprio autor

3.5 OBTENÇÃO DO ANTÍGENO DE *STRONGYLOIDES STERCORALIS*

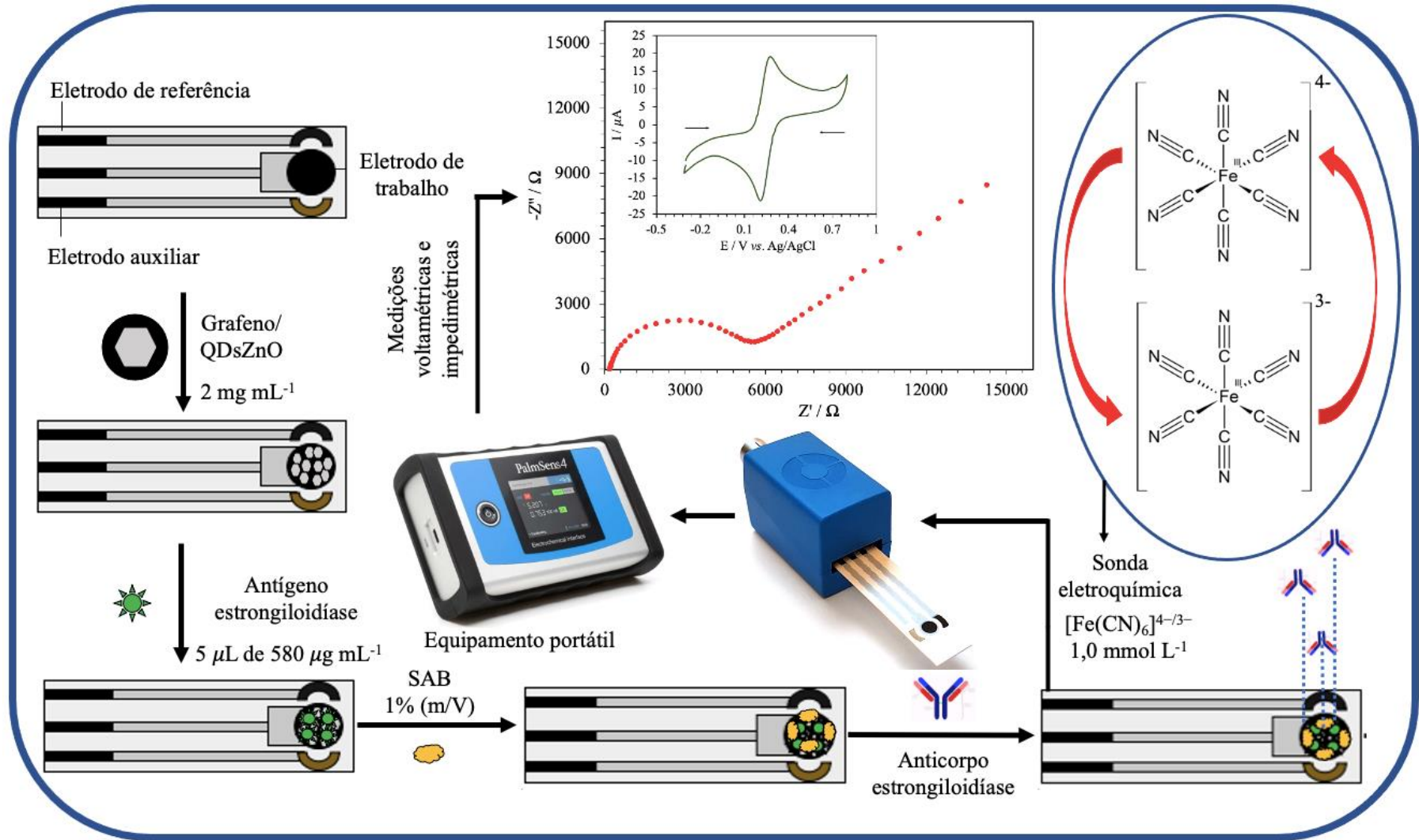
O extrato com detergente brometo de cetiltrimetilamônio foi preparado segundo o procedimento descrito por Pritchard et al. (1985) com algumas modificações. Aproximadamente 500.000 larvas infectantes de *S. stercoralis* foram incubadas por 18 h a 4°C em 1 mL de tampão fosfato salino; a mistura foi centrifugada a 12.000 x g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante (580 µg mL⁻¹) foi coletado e armazenado a -20 °C até o uso.

Foram realizadas diluições apropriadas desta solução durante estudos de otimização da concentração de antígenos imobilizados na superfície do dispositivo imunossensor proposto.

3.6 CONSTRUÇÃO DO IMUNOSSENSOR ELETROQUÍMICO E PROCEDIMENTO ANALÍTICO

A Figura 8 mostra os procedimentos de construção do imunossensor eletroquímico usando um ItalSens EIC consistindo em um eletrodo de trabalho de carbono (7,07 mm²). O EIC foi inicialmente modificado com 5 µL do compósito G-QDsZnO (2 mg mL⁻¹) (EIC/G-QDsZnO), seguido da deposição de 5 µL de uma solução de antígeno de estrogiloidíase (Ag(estr.), 10 µg mL⁻¹, em tampão Tris-HCl 0,1 mol L⁻¹, pH 7,2) (EIC/G-QDsZnO/Ag(estr.)) com um tempo de incubação de 1 h a 4 °C. Conforme citado anteriormente, os pontos quânticos de ZnO apresentam carga positiva no meio com pH próximo de 7,0 devido ao alto ponto isoelétrico, possibilitando a imobilização eletrostática dos antígenos, os quais apresentam carga negativa nas condições experimentais apresentadas. Em seguida, 5 µL de uma solução de soro albumina-bovina (1% m/V) foram depositados na superfície do dispositivo para inativar sítios não específicos. Posteriormente, o eletrodo final foi utilizado para analisar 5 µL de amostras de soro ou sangue humano, incubadas por 20 min a 25 °C (temperatura ambiente). Finalmente, após a secagem da amostra, 5 µL de uma solução tampão Tris-HCl (0.1 mol L⁻¹, pH 7.2) contendo [Fe(CN)₆]^{4-/3-} 1 mmol L⁻¹ foram depositados na superfície do EIC para realização das medidas eletroquímicas. Os voltamogramas cíclicos e lineares foram obtidos no intervalo de - 0,3 a 0,8 V, utilizando uma taxa de varredura de 50 mV s⁻¹. As medidas impedimétricas foram realizadas no modo “potencial de circuito aberto” (do inglês *open circuit mode* – OCP), no intervalo de frequência de 10 mHz a 100 kHz, utilizando uma amplitude de 10 mV. Tratando-se de um dispositivo descartável, após as análises eletroquímicas para diagnóstico clínico fez-se o descarte adequado do dispositivo imunossensor.

Figura 8. Processo de construção do imunossensor voltamétrico/impedimétrico proposto EIC/G-QDsZnO/Ag(estr.)



Fonte: o próprio autor

3.7 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE SORO DE PACIENTES

Para obtenção de soro, foram extraídos 5 mL de sangue de cada paciente ou indivíduo participante do estudo. As amostras foram deixadas coagular por 3 h a temperatura ambiente e, posteriormente, foram centrifugadas a 3.200 r.p.m. por 10 min. As amostras foram então armazenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pacientes com estrogiloidíase foram diagnosticados mediante a presença de larvas rabditiformes de *S. stercoralis* em amostras fecais através de exame microscópico. Pacientes com outras helmintíases foram diagnosticados mediante a presença de ovos de helmintos em amostras fecais através de exame microscópico. No caso dos pacientes com neurocisticercose, o diagnóstico foi feito mediante tomografia computadorizada ou ressonância magnética cerebral e sorologia positiva (presença de anticorpos específicos) mediante teste de Western-blot (HIRANO, 2012). Indivíduos aparentemente saudáveis tiveram diagnóstico negativo tanto para *S. stercoralis* quanto para outras parasitoses.

3.8 MÉTODO COMPARATIVO ELISA

Placas de poliestireno de fundo plano contendo 96 poços (Costar®, Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) foram revestidas (100 μL /poço) com o extrato antigênico (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ do extrato total solúvel) em tampão Tris-HCl (25 mmol L^{-1} , pH 7,2), incubadas durante a noite a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. As placas foram lavadas 3 vezes por 5 min cada (300 μL /poço) com solução fosfato salina (SFS)-Tween 0,1%. As placas foram tratadas com 5% de leite desnatado diluído em SFS por 2 h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, lavadas 3 vezes e depois secas. As amostras de soro foram testadas em duplicata (100 μL /poço), diluídas 1/200 em solução de bloqueio e incubadas por 45 min a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. As placas foram lavadas 3 vezes durante 5 min cada. Anticorpo de cabra anti-IgG humano conjugado a enzima peroxidase (Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) foi diluído a 1/10.000, adicionado às placas (100 μL /poço) e incubado por 45 min a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. As placas foram lavadas 3 vezes durante 5 min cada. Solução cromogênica 3,3',5,5-tetrametilbenzidina (TMB) (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, EUA) foi adicionada (100 μL /poço) e mantida por 7 min a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. A reação enzimática foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico 2 mol L^{-1} (50 μL /poço) e, em seguida, a solução resultando foi lida em espectrofotômetro a 450 nm.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

Um tratamento multivariado dos dados foi realizado usando análise discriminante por mínimos quadrados parciais para verificar a possibilidade de classificação dos perfis voltamétricos lineares obtidos empregando o imunossensor proposto (BRERETON; LLOYD, 2014; TORMENA et al., 2019). O pré-processamento dos voltamogramas (centro médio) e o modelo AD-MQP foram realizados usando o programa MATLAB R2016B® (MathWorks, Natick, EUA) e ferramentas do MQP *toolbox* versão 8.7® da Eigenvector Research (Manson, EUA). Para o conjunto de dados obtido, cada voltamograma na faixa entre -0,3 e 0,8 V foi segmentado em 0,00507 V, retendo 218 pontos de dados por amostra. Deste modo, o conjunto de dados foi organizado em uma matriz de 180 perfis voltamétricos (90 soros negativos e 90 soros positivos para estrogiloidíase) \times 218 valores de corrente obtidos por voltametria linear.

Os modelos de AD-MQP estabelecem uma regressão linear entre uma matriz independente (X) e a matriz ou vetor dependente (Y ou y , respectivamente) (BRERETON; LLOYD, 2014; GROMSKI et al., 2015), conforme citado anteriormente. No caso deste estudo, a matriz X é formada por voltamogramas com respostas positivas e negativas à estrogiloidíase, e o vetor dependente y é formado por variáveis binárias indicando a classe a que pertence cada amostra, de modo que o valor 0 foi atribuído às amostras com resposta negativa e 1 para amostras com resposta positiva para estrogiloidíase. A construção do modelo requer treinamento e validação de conjuntos de dados e, portanto, após a calibração dos modelos, amostras desconhecidas devem ser analisadas (TORMENA et al., 2019). Para a seleção do conjunto de voltamogramas de treinamento e validação, o algoritmo Kennard-Stone foi aplicado a cada uma das duas classes, considerando 70% para treinamento e 30% para validação (GOLOMSKI, 2006). Assim, foram selecionados 126 voltamogramas para treinamento (63 para cada classe) e 54 voltamogramas para validação (27 para cada classe). O valor limite foi considerado para discriminação de classe com base em suas variáveis preditas (y) - amostras com valores acima do limite pertencem à classe modelada, amostras abaixo do limite não pertencem à classe modelada (DE OLIVEIRA et al., 2020).

A dimensão ideal do modelo de AD-MQP foi determinada examinando a raiz do erro quadrático médio da validação cruzada (REQMVC) para os voltamogramas de treinamento, considerando o menor número de erros de classificação usando o método de validação cruzada veneziana (10 divisões) (TORMENA et al., 2019). As duas primeiras variáveis latentes (VL1 e VL2) foram escolhidas para a construção do modelo. Não houve presença de outliers analisando os resíduos Q e os índices T2 de Hotelling (DE OLIVEIRA et al., 2020).

Para avaliar a especificidade do imunossensor na classificação pelo modelo de AD-MQP, uma nova matriz de dados foi criada e inserida no modelo previamente construído. A nova matriz de teste de especificidade de 66 linhas continha o perfil voltamétrico obtido utilizando o imunossensor para amostras de pacientes com outras helmintíases, diferentes de estrogiloidíase (30 para ascaridíase; 6 para difilobotríase; 9 para himenolepíase; 6 para cisticercose e 15 para tricuriase), além de 218 colunas com valores de corrente obtidos por voltametria linear.

Os resultados da análise por EIE foram avaliados utilizando o programa GraphPad Prism, versão 9.0.1 (128). Gráficos de sensibilidade *versus* especificidade permitiram a determinação do ponto de corte (*cut-off*) de impedância para classificação das amostras.

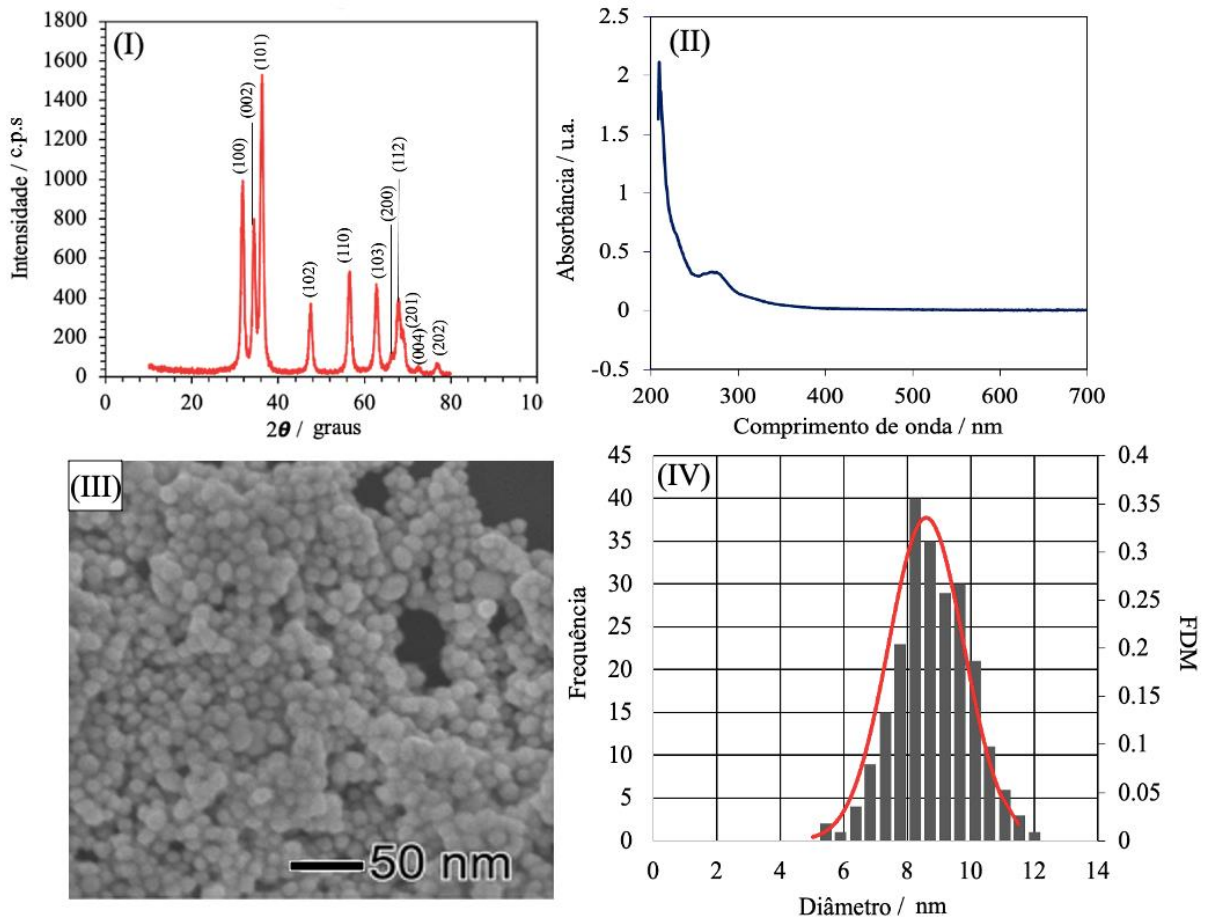
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS QUANTUM DOTS DE ZNO

A caracterização estrutural dos pontos quânticos de óxido de zinco utilizados no compósito G-QDsZnO foi realizada utilizando difração de raios-X, espectroscopia molecular e microscopia eletrônica de varredura. A Figura 9(I) apresenta o difratograma de raios-x para a amostra de QDsZnO, no qual pode-se observar um perfil característico do sistema hexagonal com os respectivos índices de Miller associados, fase wurtzita do ZnO, para o qual obteve-se 100% de pureza na síntese de acordo com os resultados de refinamento dos dados. Quando comparado aos difratogramas previamente reportados na literatura, é possível afirmar que o perfil característico levemente alargado na base dos picos indica estrutura em escala nanométrica do material, conforme esperado (KHORSAND ZAK et al., 2011).

A Figura 9(II) contém o espectro de absorção dos QDsZnO em metanol, no intervalo de 200 a 700 nm. De acordo com estudos de síntese e caracterização deste material reportados na literatura científica, a banda de absorção em torno de 275 nm caracteriza a síntese eficiente deste material nanoestruturado (KALASAD; BENDIGERI, 2018). A Figura 9(III) mostra a imagem de microscopia eletrônica de varredura para uma solução de QDsZnO em etanol sobre um suporte de silício. Com base nessas imagens, a distribuição do diâmetro do nanomaterial sintetizado foi determinada medindo individualmente o tamanho de 250 entidades. Quando a frequência de repetição de um determinado tamanho é considerada em função do diâmetro, é obtido um histograma cujo perfil é apresentado na Figura 9(IV). Com base nesses resultados, foi possível concluir que os QDsZnO sintetizados apresentam um diâmetro médio aparente de $8,5 \pm 1,2$ nm.

Figura 9. (I) Difratoograma de Raio-X (II) Espectro de absorção (III) Imagem de microscopia eletrônica de varredura e (IV) Diagrama de distribuição de tamanho para a amostra de QDsZnO



Fonte: o próprio autor

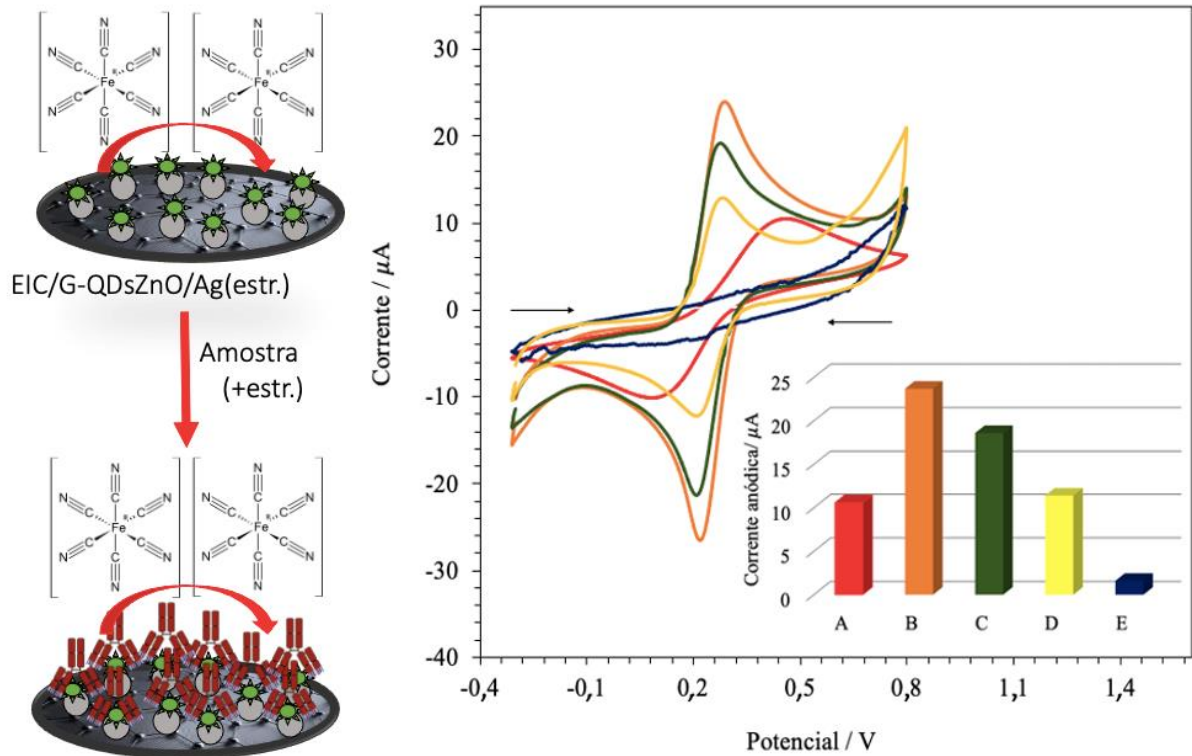
4.2 CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DO IMUNOSSENSOR EIC/G-QDsZNO/AG(ES)

A caracterização eletroquímica do dispositivo imunossensor proposto foi realizada utilizando o sistema redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ (1 mmol L^{-1}) como sonda eletroquímica, a fim de monitorar indiretamente a ligação entre anticorpos e antígenos para estrogênio na superfície do eletrodo, com base em medições impedimétricas/voltamétricas. Por ser uma ligação de reconhecimento físico das biomoléculas e não uma reação bioquímica seguida pela formação de um produto eletroativo, as medições eletroquímicas foram baseadas em mudanças na resistência a transferência de elétrons e no perfil voltamétrico da sonda redox,

parâmetros que estão diretamente relacionados a interação antígeno-anticorpo, conforme discutido abaixo.

A VC é uma das técnicas mais eficazes para caracterizar os procedimentos de construção de dispositivos bioeletrônicos (YANG et al., 2018). Conforme ilustrado na Figura 10, as correntes anódica e catódica, resultantes do processo de oxidação e redução da sonda eletroquímica, sofrem aumento significativo após a modificação com o compósito G-QDsZnO (curva B) em comparação com o EIC não modificado (curva A), o que é atribuído à alta capacidade de condução deste compósito nanoestruturado (LI et al., 2013). Notavelmente, os picos de corrente diminuem quando o extrato antigênico é imobilizado no eletrodo (curva C), devido ao fato de que a proteína depositada pode bloquear efetivamente a transferência de elétrons na interface e reduzir os sítios ativos acessíveis para a espécie redox (KAVOSI et al., 2015). Após a incubação do eletrodo com soro humano não infectado (amostra negativa para *estrongiloidíase*, curva D), as correntes de pico monitoradas diminuem por se tratar de uma matriz orgânica que também é responsável por limitar a disponibilidade dos sítios eletroativos. Quando o soro humano de um paciente infectado (amostra positiva para *estrongiloidíase*) é depositado na superfície do imunossensor, o processo eletroquímico é totalmente bloqueado e nenhum pico de corrente é medido (curva E). Este resultado indica a formação de complexos antígeno-anticorpo, conforme representado no esquema da coluna lateral ao gráfico, os quais atuam como camada de bloqueio de transferência de carga e massa para evitar a transferência eletrônica entre o centro eletroativo da sonda redox com o eletrodo, indicando a construção e a operação eficientes do imunossensor proposto (CHEN et al., 2019a).

Figura 10. Voltamogramas cíclicos (50 mV s^{-1}) obtidos utilizando (—) EIC, (—) EIC/G-QDsZnO, (—) EIC/G-QDsZnO/Ag(estr.), (—) EIC/G-QDsZnO/Ag(estr.)/(-estr.) e (—) EIC/G-QDsZnO/Ag(estr.)/Ac(+estr.) em tampão Tris-HCl ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,2) contendo $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$



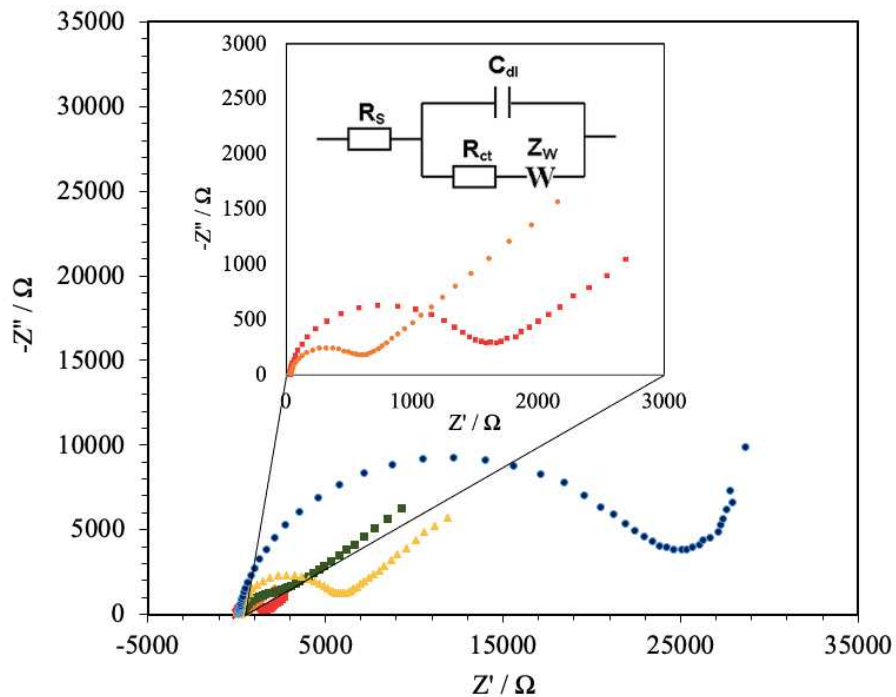
Fonte: o próprio autor

A EIE é frequentemente usada para monitorar as propriedades da interface do eletrodo durante a construção de um dispositivo imunossensor (WANG *et al.*, 2015). O circuito equivalente de Randles é um dos modelos mais simples e eficientes para avaliar processos na interface eletroquímica, incluindo apenas a resistência de solução (R_s), uma combinação paralela de um capacitor de camada dupla (C_{dl} , do inglês *double layer capacitor*), uma resistência a transferência de carga (R_{ct} , do inglês *charge transfer resistance*) e um elemento específico de difusão (elemento Warburg, W) (GAO *et al.*, 2018), como representado no circuito inserido na Figura 11.

O diagrama de Nyquist de um circuito Randles consiste em um semicírculo, no qual o diâmetro representa a resistência de transferência de carga (em frequências mais altas), enquanto a linha reta em um ângulo de 45° com o eixo real em frequências mais baixas representa o processo de difusão (controle de transferência de massa)

(PRODROMIDIS, 2010). Conforme pode ser observado na Figura 11, há uma diminuição significativa no valor de R_{ct} (diâmetro do semicírculo) após a imobilização do compósito de G-QDsZnO (curva ●) em comparação ao ECI sem modificações (curva ■), devido à condutividade excepcional deste compósito que é capaz de facilitar o processo de transporte de elétrons (LI et al., 2013). Quando o extrato antigênico de estrogiloidíase é depositado na superfície do eletrodo, o valor de R_{ct} aumenta significativamente (curva ■), refletindo sua imobilização eletrostática na superfície dos QDsZnO, reduzindo a acessibilidade da sonda eletroquímica. Quando o soro humano não infectado (-estr.) (curva ▲) é depositado na superfície de detecção, ocorre aumento da resistência a transferência eletrônica por tratar-se de uma matriz biológica, conforme descrito na discussão dos resultados por voltametria cíclica. Finalmente, quando um soro de paciente infectado (+estr., curva ●) é depositado na superfície do dispositivo, o valor de R_{ct} aumenta de forma muito expressiva. Essa observação reflete os efeitos do impedimento causado pelas moléculas de proteína ancoradas na superfície devido as interações antígeno-anticorpo, que prejudicam severamente a condutividade eletrônica (KAVOSI et al., 2015). Estas observações garantem a montagem eficiente do dispositivo bioeletrônico proposto, em plena concordância com os resultados da análise por VC.

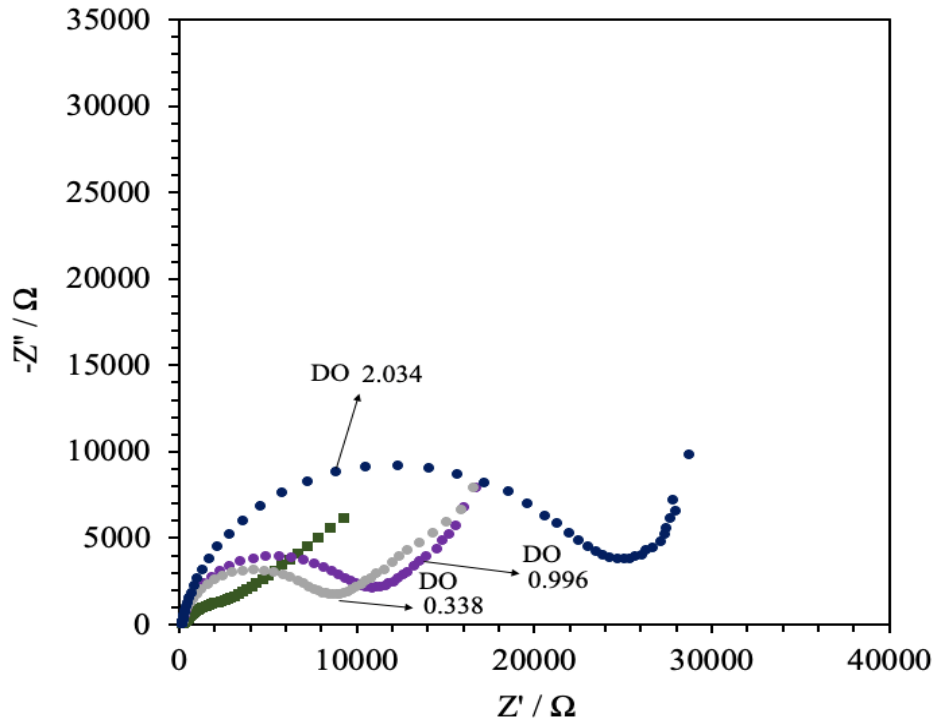
Figura 11. Diagramas de Nyquist obtidos utilizando (■) EIC, (●), EIC/G-QDsZnO, (■) EIC/G-QDsZnO/Ag(estr.), (▲) EIC/G-QDsZnO/Ag(estr.)/(-estr.) e (●) EIC/G-QDsZnO/Ag(estr.)/Ab(+estr.) em tampão Tris-HCl (0,1 mol L⁻¹, pH 7,2) contendo [Fe(CN)₆]^{3-/4-} 1,0 mmol L⁻¹. *Inserido:* expansão da região de alta frequência e circuito de Randles. *Parâmetros instrumentais:* intervalo de frequência de 10 mHz a 100 kHz; amplitude de 10 mV



Fonte: o próprio autor

Ainda com base nos resultados utilizando EIS, a Figura 12 apresenta os diagramas de Nyquist obtidos para três amostras soropositivas para estrogiloidíase, com a respectiva densidade óptica (DO) associada, que foi determinada através do teste ELISA. Como pode ser observado, é possível distinguir o nível de concentração de anticorpos entre as diferentes amostras positivas, associando o valor de DO mais baixo (menor concentração de anticorpos) ao menor valor de R_{ct} obtido através do experimento eletroquímico. Deste modo, devido a alta sensibilidade da EIS em monitorar fenômenos de superfície eletroquímica, é possível assegurar que as amostras de pacientes que apresentam menor taxa de produção de anticorpos, também causam menor perturbação na condutividade interfacial, em função da menor ocorrência dos complexos antígeno-anticorpo.

Figura 12. Diagramas de Nyquist obtidos utilizando (■) EIC/G-QDsZnO/Ag(estr.), (●) EIC/G-QDsZnO/Ag(estr.)/Ab(+1estr.), (●) EIC/G-QDsZnO/Ag(estr.)/Ab(+2estr.) e (●) EIC/G-QDsZnO/Ag(estr.)/Ab(+3estr.) em tampão Tris-HCl ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,2) contendo $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$. *Parâmetros instrumentais:* intervalo de frequência de 10 mHz a 100 kHz; amplitude de 10 mV



Fonte: o próprio autor

4.3 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS PARA CONSTRUÇÃO DO IMUNOSSENSOR

A fim de alcançar o melhor desempenho analítico em termos de bioreconhecimento do imunossensor de estrogiloidíase projetado, alguns parâmetros experimentais foram avaliados e otimizados com base no perfil voltamétrico cíclico da sonda eletroquímica ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, 1 mmol L^{-1} , em tampão Tris-HCl, pH 7,2), incluindo (I) concentração de grafeno e QDsZnO no composto nanoestruturado, (II) concentração do antígeno imobilizado e (III) tempo de incubação das amostras antes da medida eletroquímica.

Conforme apresentado do gráfico da Figura 13(I), foram avaliadas diferentes concentrações do composto, avaliando a proporção G:QDsZnO no dispositivo EIC/G-QDsZnO/Ag(estr.), conforme indicado no painel lateral. A mistura H foi escolhida para o projeto final do dispositivo pois proporcionou a maior e mais estável resposta redox

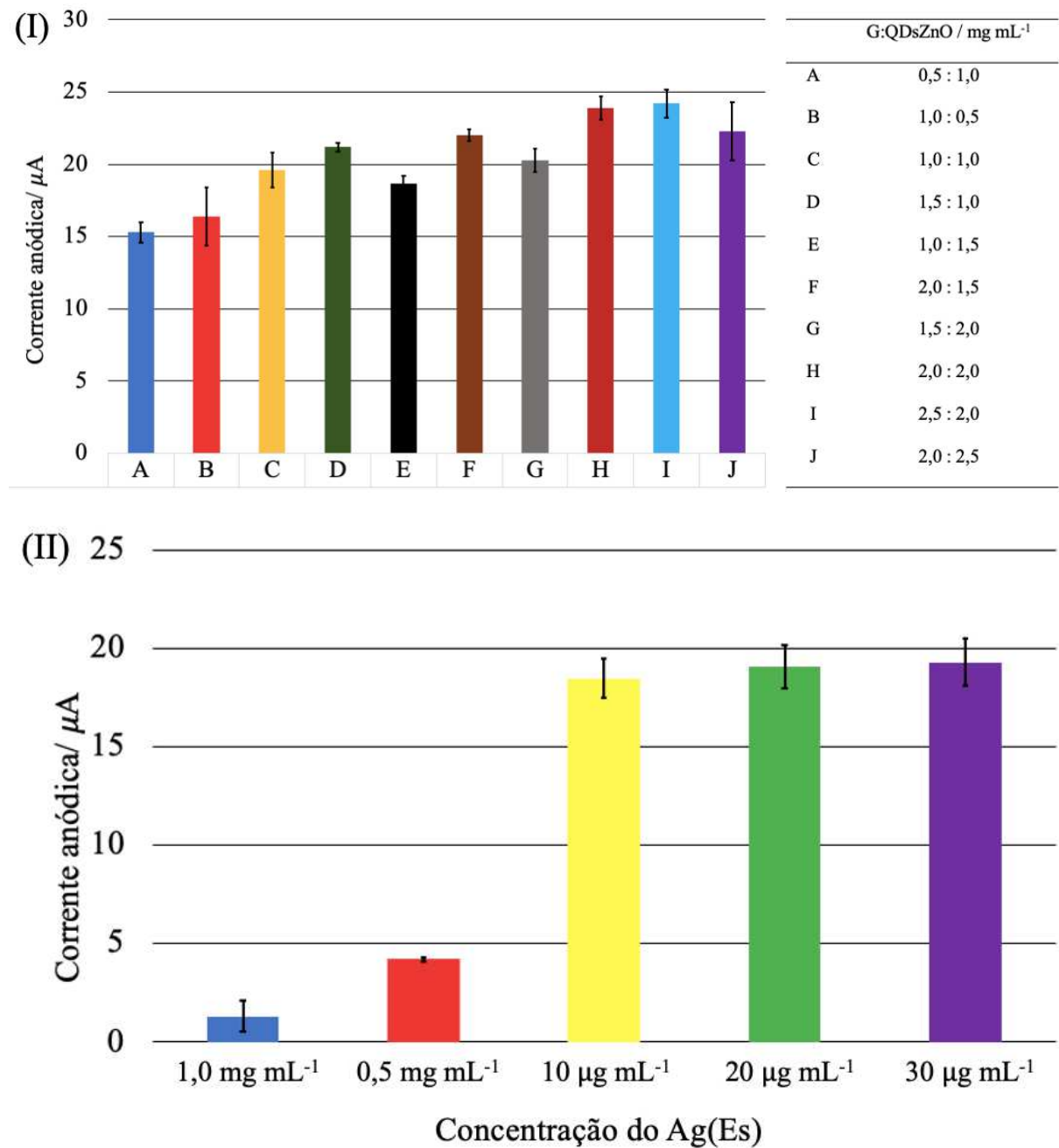
para a sonda eletroquímica, e quando comparada as misturas de maiores concentrações (I e J), considerando as barras de erro inseridas, apresenta resposta similar mesmo contendo menor concentração de materiais. Portanto, o compósito H fornece um sinal eletroquímico satisfatório e de menor custo operacional. Destaca-se a importância de se obter a maior resposta voltamétrica para a sonda durante no processo de construção, a fim de possibilitar uma distinção evidente entre os perfis de diferentes classes de amostras.

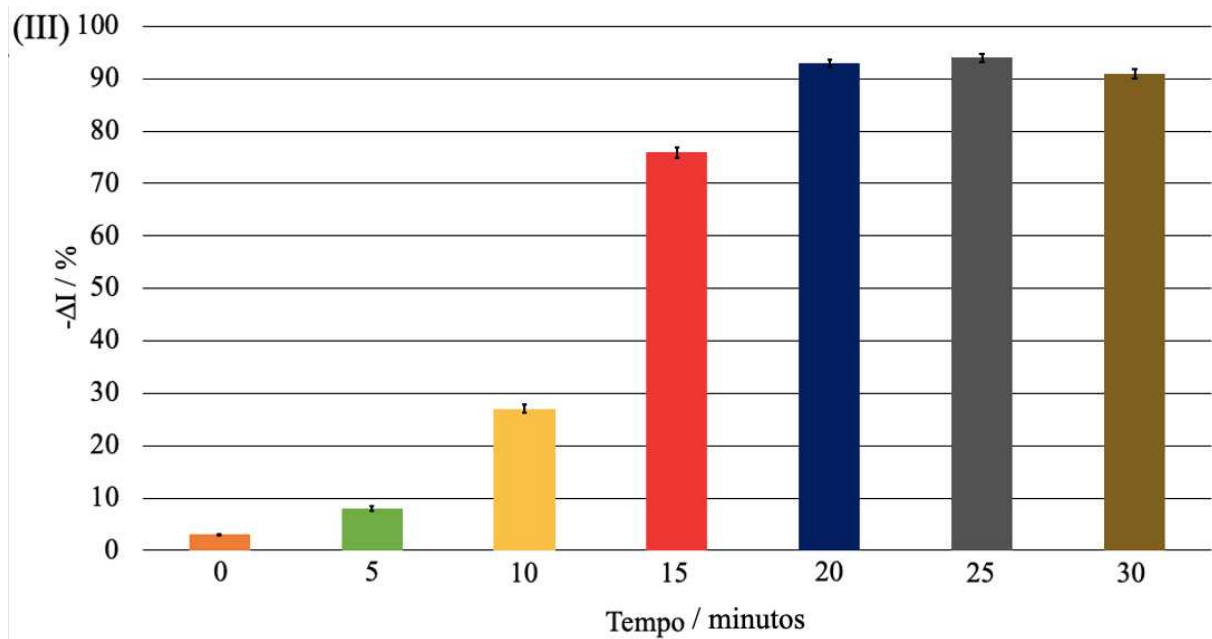
O gráfico da Figura 13(II) apresenta a corrente anódica referente a oxidação da sonda, em função de diferentes concentrações de antígeno imobilizado, nas ordens de mg mL^{-1} e $\mu\text{g mL}^{-1}$. Como pode ser observado, altas concentrações do extrato antigênico provocam o bloqueio total da superfície, resultando em correntes muito baixas, não permitindo a distinção entre as amostras positivas e negativas. Deste modo, a concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ foi selecionada, visto que forneceu respostas semelhantes as soluções de maiores concentrações, considerando o desvio padrão apresentado nas barras de erro. Concentrações inferiores a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ resultaram na necessidade de maiores tempos de incubação das amostras, afetando a capacidade operacional do teste rápido.

Finalmente, a Figura 13(III) apresenta a variação da corrente anódica, referente a oxidação da sonda, em função do tempo de incubação. Os resultados indicaram que é necessário um tempo mínimo de 20 minutos para que seja possível uma diminuição no valor de corrente superior a 90%, permitindo a distinção entre amostras positivas e negativas. Novamente, com base no desvio padrão apresentado nas barras de erro, não há alteração significativa na resposta fornecida utilizando maiores tempos de incubação. Destaca-se que o tempo de vinte minutos é 56% menor que o tempo de incubação necessário durante o procedimento experimental do teste padrão ELISA, evidenciando uma das vantagens do dispositivo proposto, em termos de eficiência e frequência analítica.

A fim de avaliar a reprodutibilidade da construção do dispositivo EIC/G-QDsZnO/Ag(estr.), foram construídos dez imunossensores independentes que foram utilizados no monitoramento da corrente anódica da sonda $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ (1 mmol L^{-1}) em tampão Tris-HCl (pH 7,2), obtendo-se um desvio padrão relativo (DPR) inferior a 2%. Este resultado evidencia um excelente desempenho na reprodutibilidade durante a construção do dispositivo conforme o projeto proposto.

Figura 13. Gráfico em barras referente ao estudo da concentração (I) do compósito G/QDsZnO e (II) do antígeno de *S. stercoralis* no dispositivo EIC/G-QDsZnO/Ag(estr.); (III) estudo do tempo de incubação das amostras de soro de pacientes





Fonte: o próprio autor

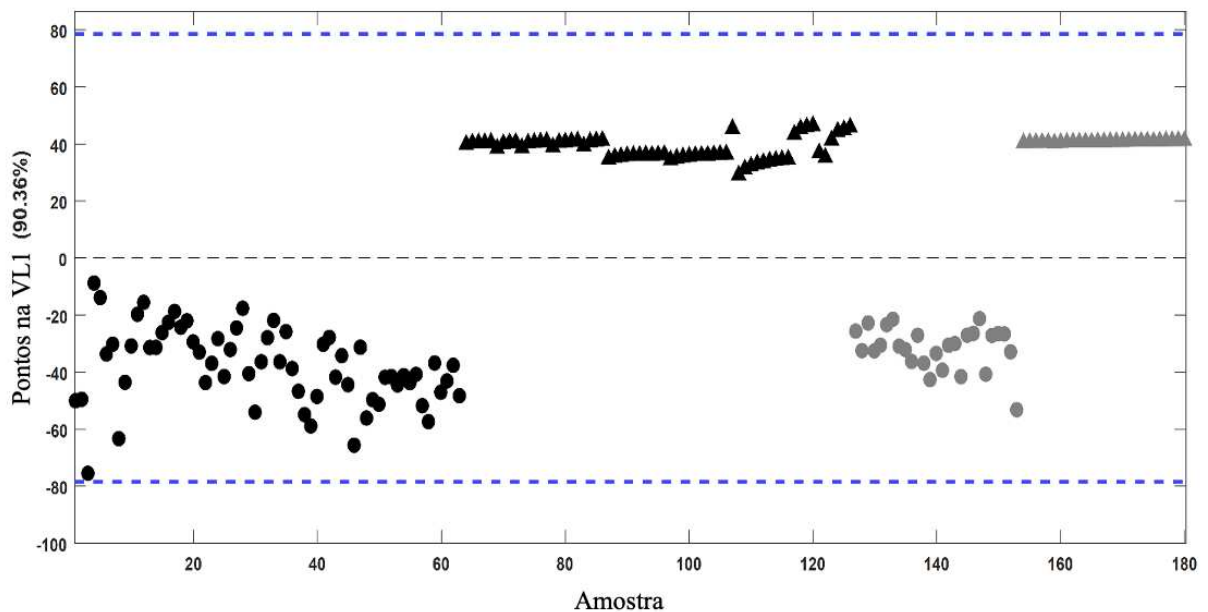
4.4 APLICAÇÃO DO MODELO DE AD-MQP PARA CLASSIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE SORO SANGUÍNEO

O uso do imunossensor pode ser acoplado a modelos de classificação utilizando os perfis voltamétricos obtidos na análise dos soros de pacientes, a fim de identificar casos de infecção parasitária. Conforme descrito anteriormente, a modelagem AD-MQP foi aplicada como uma ferramenta de diagnóstico direto baseada no perfil da sonda eletroquímica utilizando voltametria linear. A precisão do modelo AD-MQP foi avaliada por meio da análise dos quadrados médios da raiz da validação cruzada (QMRVC) (0,126), do erro dos quadrados médios da raiz da calibração (EQMRC) (0,124) e do erro dos quadrados médios da raiz da previsão (EQMRP) (0,100) para a VL1. De acordo com a fundamentação teórica do modelo estatístico utilizado, valores semelhantes de QMRVC e EQMRC, e ambos inferiores ao valor de EQMRP, indicam a ótima precisão do modelo (BRERETON; LLOYD, 2014). Além disso, o coeficiente de determinação (R^2) com um valor de 0,98 mostra que os voltamogramas de calibração (X) são altamente correlacionados com o vetor dependente (y) (TORMENA et al., 2019).

Os valores da variável latente 1 do modelo AD-MQP mostram claramente a boa discriminação entre as amostras com soro positivo e negativo para estrogiloidíase na VL1 conforme Figura 14. Além disso, é possível verificar que a dispersão entre os indivíduos com soro positivo é muito menor do que a dispersão obtida para os pacientes com soro

negativo, evidenciando uma resposta eletroquímica uniforme para a interação antígeno-anticorpo.

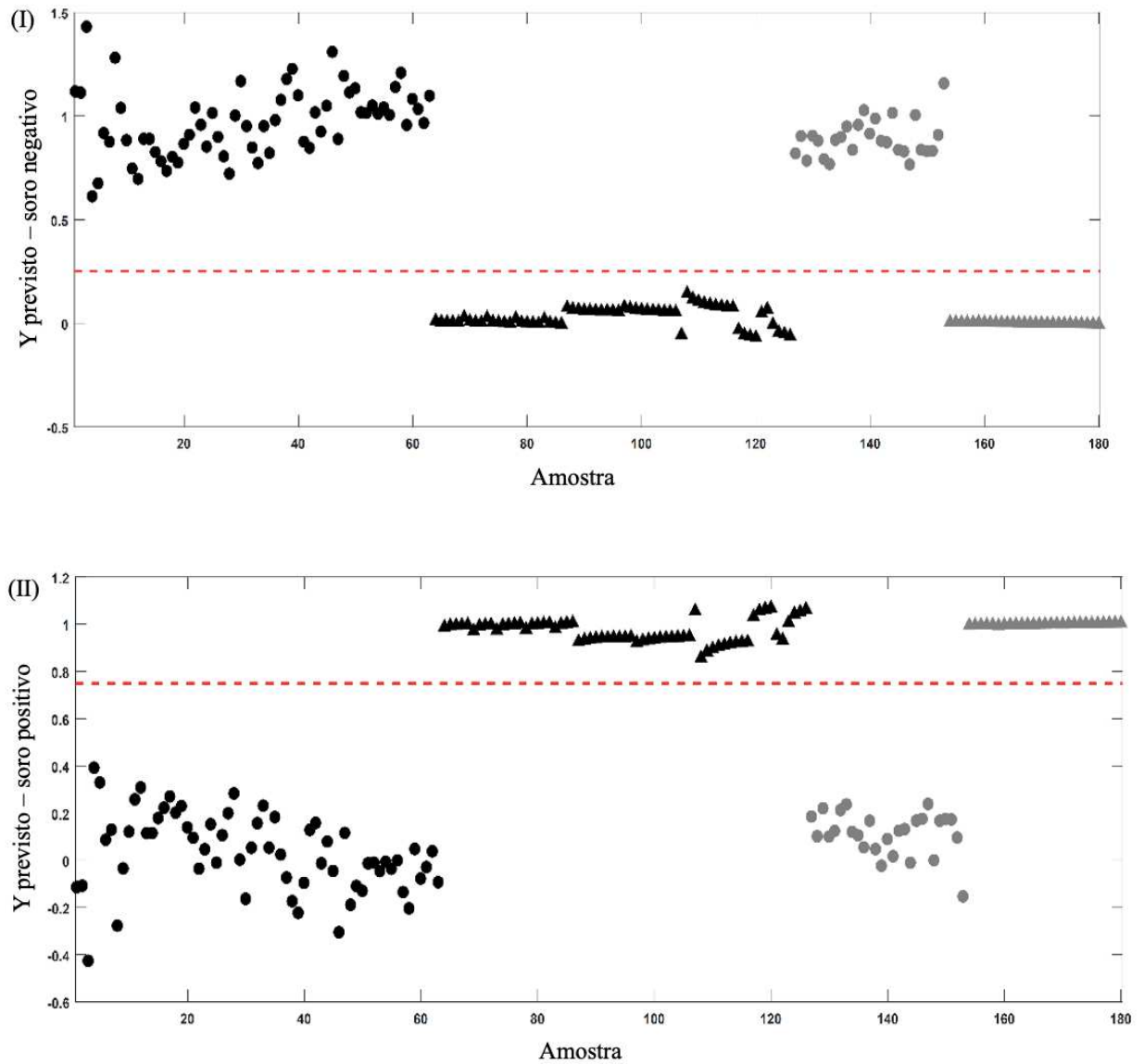
Figura 14. Gráfico dos pontos da VL1 versus amostras para discriminar soros positivo (\blacktriangle ; \blacktriangle) e negativo (\bullet ; \bullet) com base no perfil voltamétrico da sonda $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ ($1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, Tris-HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,2) utilizando o imunossensor de estrogiloidíase. A cor preta corresponde às pontuações de calibração (amostras de treinamento) e as pontuações em cinza às amostras de validação (amostras de teste) do modelo AD-MQP



Fonte: o próprio autor

A Figura 15 mostra a separação clara entre as amostras de soro negativo e positivo para estrogiloidíase com base no valor limite estabelecido pelo modelo. A Figura 15(I) mostra a classificação com base no valor limite para y previsto para o soro negativo e a Figura 15(II) para o soro positivo. As amostras de treinamento e validação foram classificadas corretamente em ambos os casos. Os parâmetros de qualidade do modelo, sensibilidade e especificidade, são apresentados na Tabela 1. Os valores de sensibilidade e especificidade iguais a 1, indicam que o modelo AD-MQP apresenta excelente capacidade de diferenciar e classificar amostras de soro positivo e negativo para estrogiloidíase (TOLESSA et al., 2016).

Figura 15. Modelo de predição por AD-MQP para soro negativo (I) e soro positivo (II) a partir do perfil voltamétrico da sonda $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ ($1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, Tris-HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,2) utilizando o imunossensor de estrogiloidíase; sendo (●) amostras de treinamento de soro negativas, (●) amostras de validação de soro negativas, (▲) amostras de treinamento de soro positivas, (▲) amostras de validação de soro positivas e (— — —) valor limite



Fonte: o próprio autor

Tabela 1. Resultados da classificação AD-MQP para duas classes com base no perfil voltamétrico do imunossensor para pacientes com soro positivo e negativo para *estrongiloidíase*

Classe	Soro positivo	Soro negativo
Sensibilidade (Cal)	1,000	1,000
Especificidade (Cal)	1,000	1,000
Sensibilidade (Pred)	1,000	1,000
Especificidade (Pred)	1,000	1,000

Fonte: o próprio autor

A verificação da classificação realizada pelo modelo AD-MQP foi baseada nos resultados do método ELISA para diagnóstico de *estrongiloidíase*. A Tabela 2 apresenta os resultados de diagnósticos realizados empregando o dispositivo imunossensor proposto com os respectivos valores de corrente de pico anódica associados (medições em triplicata, no ponto $E = 0,3 \text{ V}$), além dos resultados provenientes do método ELISA atualmente utilizado para testagem imunológica, com as respectivas densidades ópticas (medições em triplicata, sendo $\lambda = 450 \text{ nm}$) associadas as amostras. Conforme pode ser observado, os diagnósticos obtidos empregando o modelo de análise multivariada dos resultados fornecidos pelo imunossensor proposto estão em concordância absoluta com os resultados do método ELISA, confirmando a aplicabilidade do dispositivo para diagnóstico clínico proposto neste estudo.

Tabela 2. Resultados da análise dos soros de pacientes empregando modelo AD-MQP associado ao imunossensor de *estrongiloidíase* projetado; e resultados do método comparativo ELISA

Amostra	$I / \mu\text{A}$	Resultado AD-MQP	D.O.	Resultado ELISA
1	$0,930 \pm 0,020$	+estr.	$2,734 \pm 0,310$	+estr.
2	$0,953 \pm 0,031$	+estr.	$1,464 \pm 0,172$	+estr.
3	$0,967 \pm 0,010$	+estr.	$3,541 \pm 0,230$	+estr.
4	$0,966 \pm 0,043$	+estr.	$2,099 \pm 0,100$	+estr.
5	$0,970 \pm 0,010$	+estr.	$0,715 \pm 0,025$	+estr.
6	$0,970 \pm 0,021$	+estr.	$1,916 \pm 0,128$	+estr.

7	0,969±0,042	+estr.	1,698±0,045	+estr.
8	0,970±0,031	+estr.	0,459±0,317	+estr.
9	0,966±0,003	+estr.	0,401±0,200	+estr.
10	0,968±0,017	+estr.	0,232±0,028	+estr.
11	1,042±0,002	+estr.	1,138±0,254	+estr.
12	0,973±0,032	+estr.	0,350±0,071	+estr.
13	0,968±0,017	+estr.	0,900±0,048	+estr.
14	0,964±0,024	+estr.	0,218±0,012	+estr.
15	0,963±0,018	+estr.	1,036±0,086	+estr.
16	0,960±0,005	+estr.	2,500±0,271	+estr.
17	0,959±0,026	+estr.	2,329±0,105	+estr.
18	0,957±0,031	+estr.	3,491±0,310	+estr.
19	0,955±0,042	+estr.	0,967±0,076	+estr.
20	0,951±0,009	+estr.	0,281±0,025	+estr.
21	1,044±0,067	+estr.	1,432±0,328	+estr.
22	0,961±0,029	+estr.	0,986±0,086	+estr.
23	0,953±0,085	+estr.	1,876±0,143	+estr.
24	0,951±0,068	+estr.	2,322±0,412	+estr.
25	0,946±0,076	+estr.	0,762±0,134	+estr.
26	0,946±0,081	+estr.	3,108±0,457	+estr.
27	0,944±0,039	+estr.	2,156±0,217	+estr.
28	0,941±0,025	+estr.	0,658±0,090	+estr.
29	0,938±0,100	+estr.	1,441±0,100	+estr.
30	0,933±0,115	+estr.	0,764±0,135	+estr.
31	11,103±0,093	-estr.	0,204±0,054	-estr.
32	11,317±0,235	-estr.	0,093±0,005	-estr.
33	11,741±0,300	-estr.	0,119±0,008	-estr.
34	8,155±0,176	-estr.	0,150±0,029	-estr.
35	8,863±0,230	-estr.	0,145±0,037	-estr.
36	10,544±0,343	-estr.	0,084±0,001	-estr.
37	11,452±0,400	-estr.	0,093±0,002	-estr.
38	11,275±0,341	-estr.	0,157±0,031	-estr.

39	11,077±0,120	–estr.	0,086±0,003	–estr.
40	12,619±0,200	–estr.	0,100±0,006	–estr.
41	11,000±0,176	–estr.	0,076±0,004	–estr.
42	10,200±0,239	–estr.	0,088±0,008	–estr.
43	9,780±0,100	–estr.	0,091±0,003	–estr.
44	10,190±0,301	–estr.	0,084±0,004	–estr.
45	9,173±0,205	–estr.	0,071±0,001	–estr.
46	11,184±0,136	–estr.	0,060±0,002	–estr.
47	11,518±0,110	–estr.	0,086±0,002	–estr.
48	11,297±0,024	–estr.	0,119±0,012	–estr.
49	10,630±0,356	–estr.	0,120±0,024	–estr.
50	10,556±0,248	–estr.	0,112±0,084	–estr.
51	9,941±0,371	–estr.	0,198±0,071	–estr.
52	9,412±0,207	–estr.	0,140±0,063	–estr.
53	10,293±0,305	–estr.	0,075±0,007	–estr.
54	10,381±0,103	–estr.	0,173±0,032	–estr.
55	10,073±0,132	–estr.	0,107±0,018	–estr.
56	9,998±0,200	–estr.	0,101±0,023	–estr.
57	11,138±0,243	–estr.	0,095±0,008	–estr.
58	11,398±0,123	–estr.	0,086±0,004	–estr.
59	11,679±0,200	–estr.	0,071±0,001	–estr.
60	11,056±0,314	–estr.	0,078±0,002	–estr.

Fonte: o próprio autor

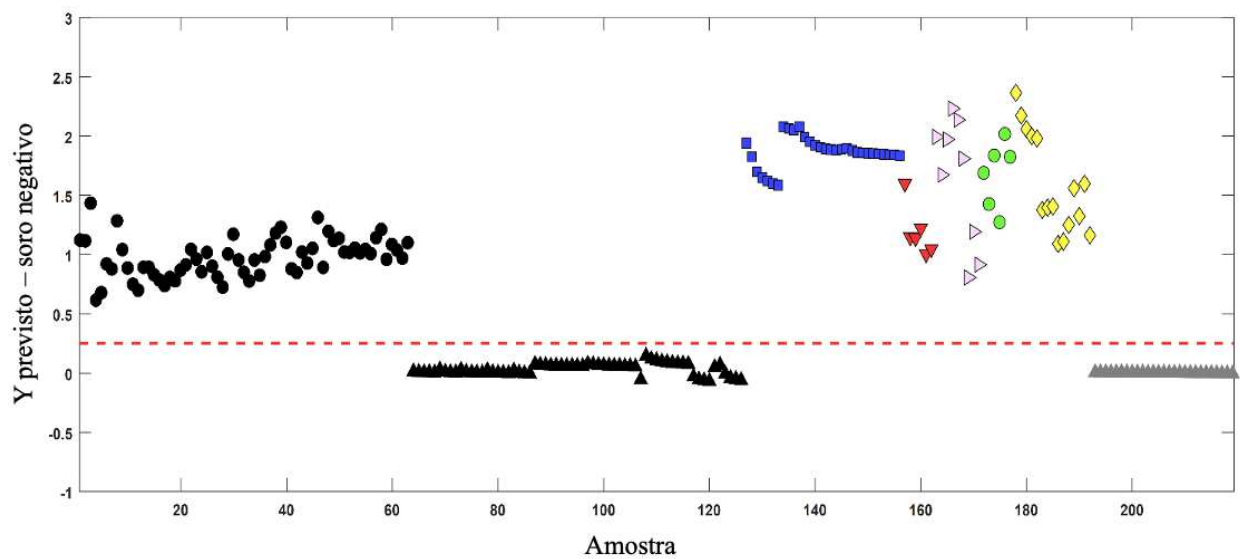
4.5 PROVA DE CONCEITO: ESPECIFICIDADE DO IMUNOSSENSOR PROPOSTO NA PRESENÇA DE DIFERENTES HELMINTÍASES

Conforme apresentado anteriormente, a interação antígeno-anticorpo é uma reação bioquímica altamente específica entre os anticorpos produzidos pelas células brancas do sangue e os antígenos, durante a formação do complexo imunológico, processo denominado aglutinação. O princípio da especificidade da interação Ag-Ac consiste na constituição química específica de cada anticorpo. A região molecular denominada parátopo é

o sítio combinatório que se liga ao antígeno, e encontra-se na região variável da cadeia polipeptídica com sequências únicas de aminoácidos em cada anticorpo, produzidos para diferentes tipos de doenças (MARSHALL et al., 2018). Essa organização estrutural específica permite a aplicação de testes imunológicos para fins de diagnóstico clínico, conforme proposto neste estudo.

Deste modo, a especificidade do imunossensor em relação a outras doenças foi testada em pacientes com soro negativo para estrogiloidíase, mas com soro positivo para outras cinco parasitoses causadas por vermes, utilizando o modelo AD-MQP previamente construído (Figura 15 e Tabela 1). As helmintíases avaliadas incluem ascaridíase (asc.), difilobotríase (dif.), himenolepíase (him.), cisticercose (cist.) e tricuriase (tric.), as quais são causadas pelos helmintos *Ascaris lumbricoides*, *Diphilobotrium*, *Hymenolepis*, *Taenia Solium* e *Trichuris Trichiuris*, respectivamente. Considerando os resultados do método padrão ELISA, o modelo classificou corretamente 100% das amostras em soro negativo para estrogiloidíase, apresentando alta sensibilidade e especificidade de predição, conforme gráfico da Figura 16 e Tabela 3. Esses resultados confirmam a especificidade do imunossensor de estrogiloidíase na presença de outras doenças, além da excelente precisão do modelo de classificação baseado nos perfis voltamétricos da sonda eletroquímica.

Figura 16. Predição do modelo AD-MQP para soro negativo a partir do perfil voltamétrico da sonda $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ ($1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, Tris-HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,2) utilizando o imunossensor de estrogiloidíase com a inclusão do teste de especificidade para outras helmintíases, sendo (●) amostras de treinamento negativas, (■) ascaridíase, (▼) difilobotríase, (►) himenolepíase, (●) cisticercose, (◆) tricuriase, (▲) amostras de treinamento positivas, (▲) amostras de validação positivas e (—) o valor limite



Fonte: o próprio autor

Tabela 3. Resultados da análise dos soros de pacientes empregando modelo AD-MQP associado ao imunossensor de estrogiloidíase projetado; e resultados do método comparativo ELISA para diferentes helmintíases

	Amostras	I / μA	Resultado AD-MQP	D.O.	Resultado ELISA
	1	$20,071 \pm 1,394$	-estr.	$0,195 \pm 0,001$	-estr./+asc.
	2	$19,708 \pm 0,956$	-estr.	$0,379 \pm 0,102$	-estr./+asc.
	3	$19,515 \pm 0,753$	-estr.	$0,224 \pm 0,053$	-estr./+asc.
	4	$19,453 \pm 1,034$	-estr.	$0,228 \pm 0,072$	-estr./+asc.
Ascaridíase	5	$19,415 \pm 0,536$	-estr.	$0,423 \pm 0,107$	-estr./+asc.
	6	$22,100 \pm 1,483$	-estr.	$0,256 \pm 0,064$	-estr./+asc.
	7	$23,570 \pm 0,671$	-estr.	$0,572 \pm 0,218$	-estr./+asc.

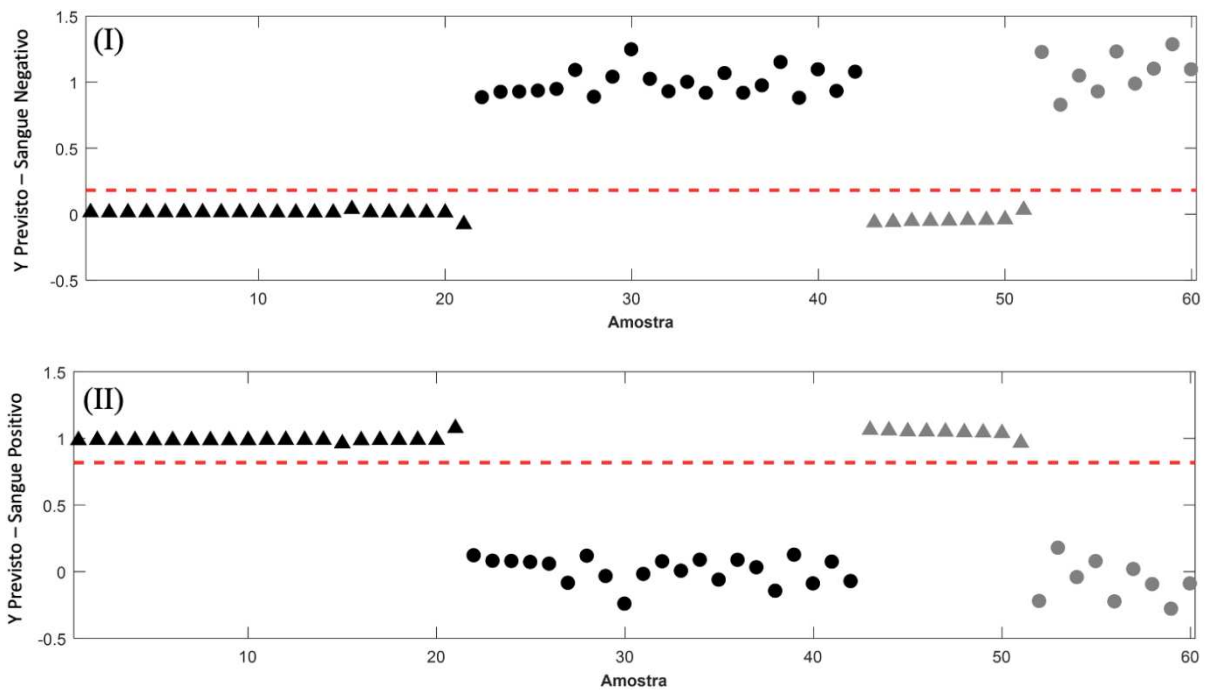
	8	23,130±0,879	-estr.	0,310±0,134	-estr./ +asc.
	9	22,740±1,371	-estr.	0,654±0,098	-estr./ +asc.
	10	22,560±0,623	-estr.	0,588±0,158	-estr./ +asc.
Difilobotríase	1	13,850±1,319	-estr.	0,264±0,037	-estr./ +dif.
	2	12,487±1,643	-estr.	0,329±0,100	-estr./ +dif.
Himenolepiase	1	11,546±1,239	-estr.	0,669±0,041	-estr./+him.
	2	18,427±1,210	-estr.	0,241±0,016	-estr./+him.
	3	20,060±1,199	-estr.	0,660±0,011	-estr./+him.
Cisticercose	1	17,216±1,205	-estr.	0,884±0,134	-estr./+cist.
	2	22,740±1,189	-estr.	0,842±0,156	-estr./+cist.
Tricuríase	1	16,423±1,175	-estr.	0,733±0,087	-estr./+tric.
	2	23,590±1,593	-estr.	0,566±0,076	-estr./ +tric.
	3	15,556±1,142	-estr.	0,997±0,148	-estr./ +tric.
	4	13,510±1,139	-estr.	0,886±0,135	-estr./ +tric.
	5	16,320±1,119	-estr.	0,624±0,124	-estr./ +tric.

Fonte: o próprio autor

4.6 APLICAÇÃO DO MODELO DE AD-MQP PARA CLASSIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE SANGUE

A fim de avaliar a possibilidade de aplicação do dispositivo imunossensor proposto na análise direta de amostras de sangue, utilizando voltametria linear como técnica de monitoramento da interação antígeno-anticorpo e $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ como sonda eletroquímica, foram feitos ensaios imunológicos utilizando trinta amostras de sangue de pacientes positivos e trinta amostras de pacientes negativos para estrogiloidíase. Aplicando-se o modelo de AD-MQP para os voltamogramas lineares obtidos, foram gerados os gráficos apresentados na Figura 17 (I) e (II), para amostras negativas e positivas, respectivamente.

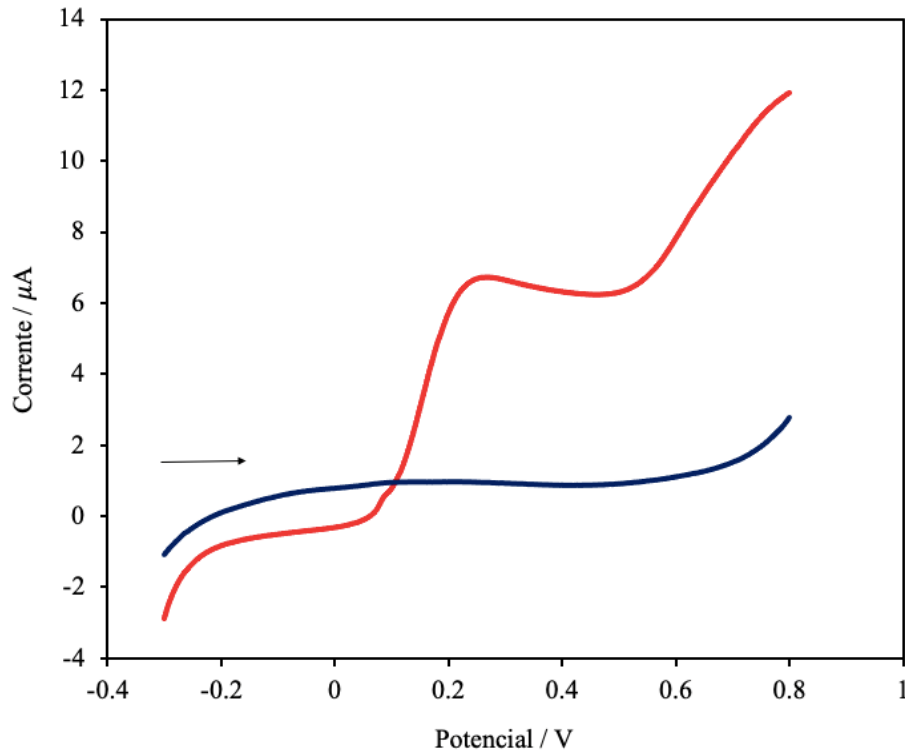
Figura 17. Modelo de predição por AD-MQP para **(I)** sangue negativo e **(II)** sangue positivo **(II)** a partir do perfil voltamétrico da sonda $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ ($1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, Tris-HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,2) utilizando o imunossensor de estrogiloidíase; sendo (●) amostras de treinamento de sangue negativas, (●) amostras de validação de sangue negativas, (▲) amostras de treinamento de sangue positivas, (▲) amostras de validação de sangue positivas e (— — —) valor limite



Fonte: o próprio autor

Como pode ser observado, a aplicação do imunossensor em conjunto com o modelo de classificação por AD-MQP foi capaz de classificar corretamente todas as amostras de sangue testadas, considerando que são amostras do mesmo conjunto de soros sanguíneos, já validadas por comparação ao método padrão ELISA. A grande vantagem em analisar-se diretamente amostras de sangue resume-se à simplificação do preparo de amostra, excluindo o processo de obtenção do soro sanguíneo. Ademais, com base nesses resultados, pode-se concluir que o dispositivo projetado é altamente específico, de modo que os componentes do sangue não afetam a formação do imunocomplexo na superfície do imunossensor, tampouco a resposta eletroquímica discriminatória da sonda eletroquímica, conforme ilustrado nos voltamogramas da Figura 18.

Figura 18. Voltamogramas lineares (50 mV s^{-1}) obtidos utilizando o EIC/G-QDsZnO/Ag(estr.) para amostra de sangue (—) negativa e (—) positiva, em tampão Tris-HCl ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,2) contendo $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$



Fonte: o próprio autor

4.7 DIAGNÓSTICO DE ESTRONGILOIDÍASE PARA PACIENTES IMUNOCOMPETENTES E IMUNODEPRIMIDOS BASEADO EM MEDIDAS DE EIE

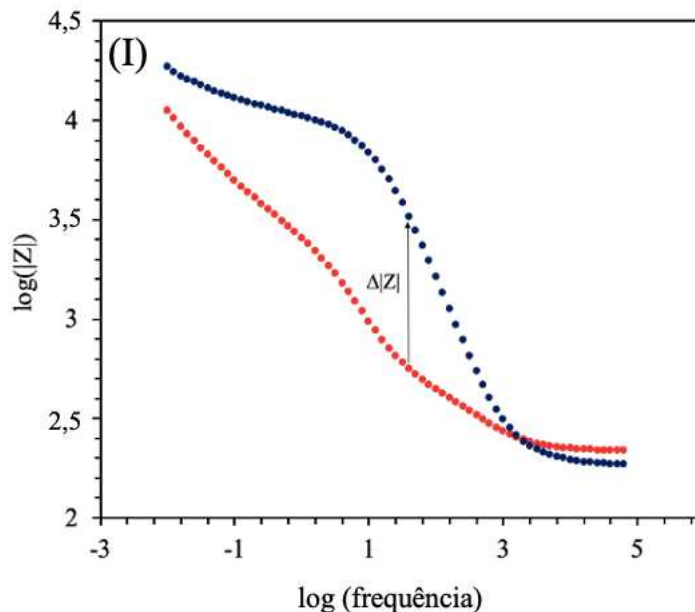
Conforme apresentado na seção 4.2, a EIE é capaz de traduzir a interação antígeno-anticorpo através de variações no valor da resistência a transferência de carga, determinada a partir do diagrama Nyquist (DE ALMEIDA et al., 2020). Entretanto, o experimento que resulta neste diagrama demanda tempo, visto que se faz uma varredura de frequências para aquisição dos valores de impedância. Durante um experimento de EIE, além do gráfico de Nyquist, gera-se o diagrama de Bode, que relaciona o valor do logaritmo do módulo da impedância como variável dependente, calculado de acordo com a Equação 3 (Z' -parcela imaginária; Z'' -parcela real), com o domínio do logaritmo de frequências aplicadas (variável independente) (LVOVICH; WILEY INTERSCIENCE (ONLINE SERVICE), 2012).

$$|Z| = \sqrt{(Z')^2 + (Z'')^2}$$

Equação 3

A Figura 19 apresenta o gráfico de Bode para o imunossensor na ausência de amostra, além do perfil do dispositivo contendo a amostra positiva de um paciente imunocompetente de menor concentração de anticorpos. A partir da análise comparativa desses perfis, determinou-se o valor de frequência igual a 40 Hz, no qual observa-se a maior diferença entre o valor de impedância do imunossensor sem amostra e na presença de uma amostra positiva, a fim de garantir a maior sensibilidade em relação a ligação antígeno-anticorpo, mesmo em amostras com baixas concentrações de anticorpos.

Figura 19. Diagrama de bode para (●) EIC/G-QDsZnO/Ag(estr.) e (●) EIC/G-QDsZnO/Ag(estr.)/Ab(+estr.); intervalo de frequência: 10 mHz – 100 kHz, na presença da sonda $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ (1,0 mmol L⁻¹, Tris-HCl 0,1 mol L⁻¹, pH 7,2)

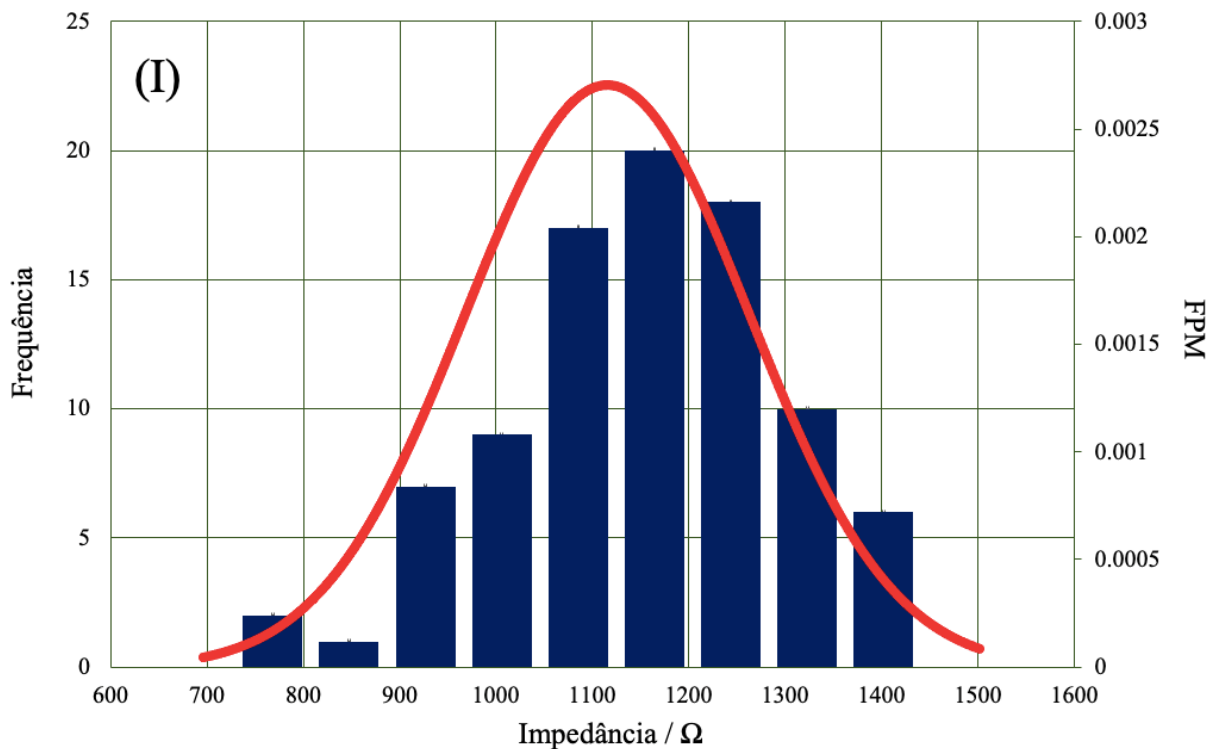


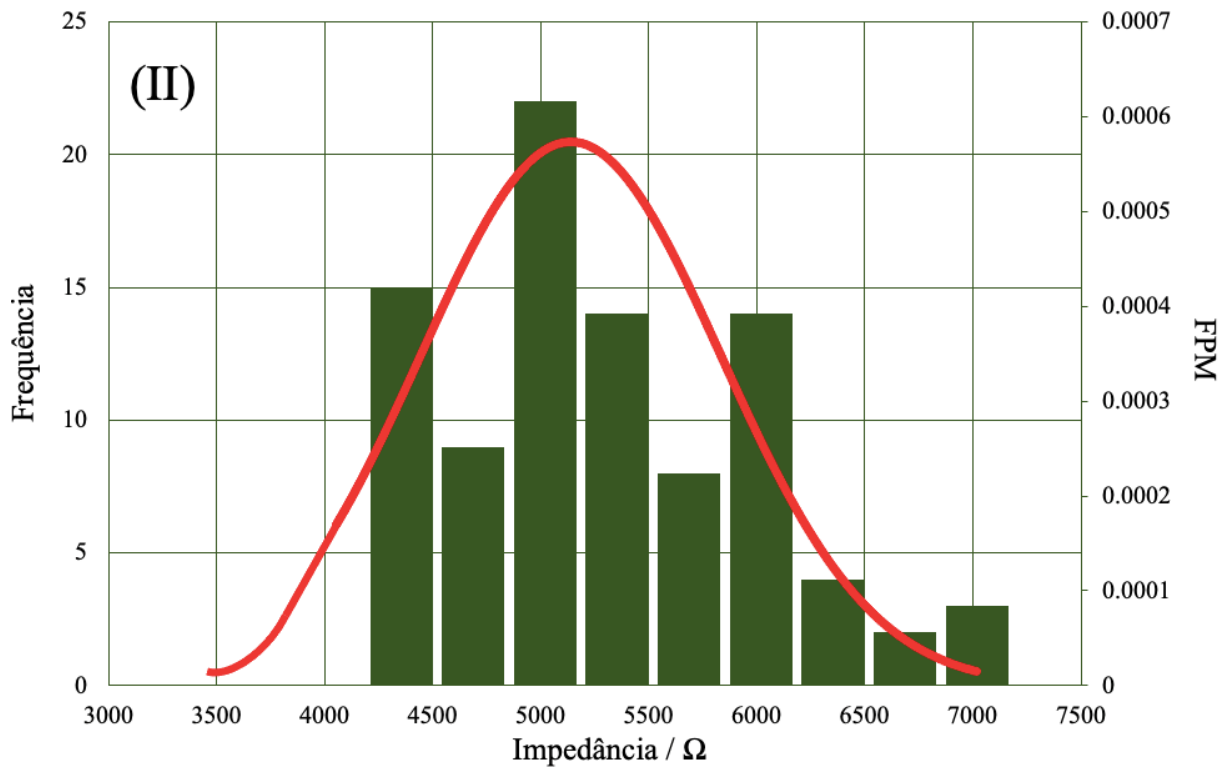
Fonte: o próprio autor

A fim de avaliar a capacidade de classificação de amostras de soro sanguíneo com base no módulo de impedância, realizou-se o imunoenensaio de noventa amostras positivas e noventa negativas para estrogiloidíase na superfície do dispositivo proposto, na presença da sonda $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ (1,0 mmol L⁻¹, Tris-HCl 0,1 mol L⁻¹, pH 7.2) e aplicando-se 40 Hz de frequência para obtenção de um único ponto de impedância.

Paralelamente, a fim de avaliar a especificidade do dispositivo utilizando EIE, entre as amostras negativas existem amostras positivas para outras helmintíases, as mesmas descritas no estudo de especificidade utilizando voltametria. A Figura 20 apresenta os histogramas (Frequência) e distribuição normal (Função Probabilidade de Massa, FPM) em função dos módulos de impedância monitorados para amostras negativas e positivas.

Figura 20. Histogramas e distribuição normal dos valores de impedância monitorados a 40 Hz para amostras **(I)** Negativas e **(II)** Positivas para estrogiloidíase, utilizando o dispositivo EIC/G-QDsZnO/Ag(estr.) na presença da sonda $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ ($1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, Tris-HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,2)



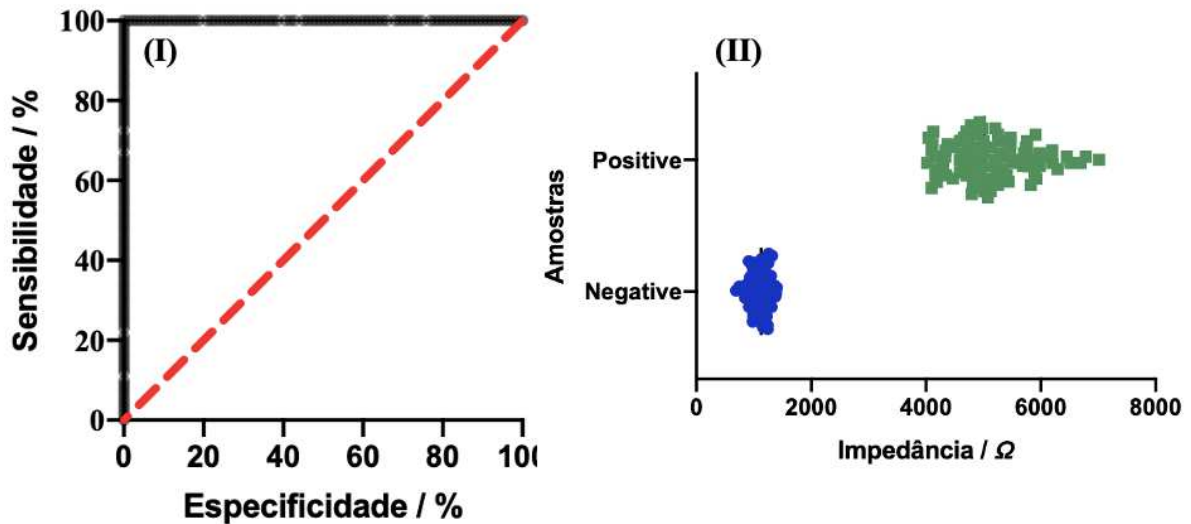


Fonte: o próprio autor

A partir dos gráficos apresentados, pode-se determinar um valor médio de impedância igual a $1115 \pm 148 \Omega$ para amostras negativas e $5137 \pm 695 \Omega$ para amostras positivas. Entretanto, no contexto de diagnóstico clínico, esses intervalos não são eficientes para classificação de amostras de pacientes, considerando que existe um “gap” de valores de impedância que os modelos de distribuição normal não abrangem. Deste modo, faz-se necessário o uso de ferramentas estatísticas de tratamento de dados para determinar o melhor ponto de “*cutoff*”, ou seja, o ponto de corte de impedância eletroquímica a partir do qual classifica-se a amostra como positiva.

A Figura 21(I) apresenta a curva ROC, para os 180 pontos (90 positivos e 90 negativos) de impedância. Matematicamente, essa curva relaciona a sensibilidade, que é a razão entre os números corretamente identificados positivos e o número total observado; enquanto a especificidade (eixo X) é dada pela razão entre os números corretamente identificados negativos e o número total observado. A Figura 21(II) apresenta a distribuição gráfica dos pontos de impedância utilizados para construção da curva ROC.

Figura 21. (I) Curva ROC para determinação do *cutoff* de impedância e (II) Disposição gráfica dos pontos de impedância para amostras positivas e negativas



Fonte: o próprio autor

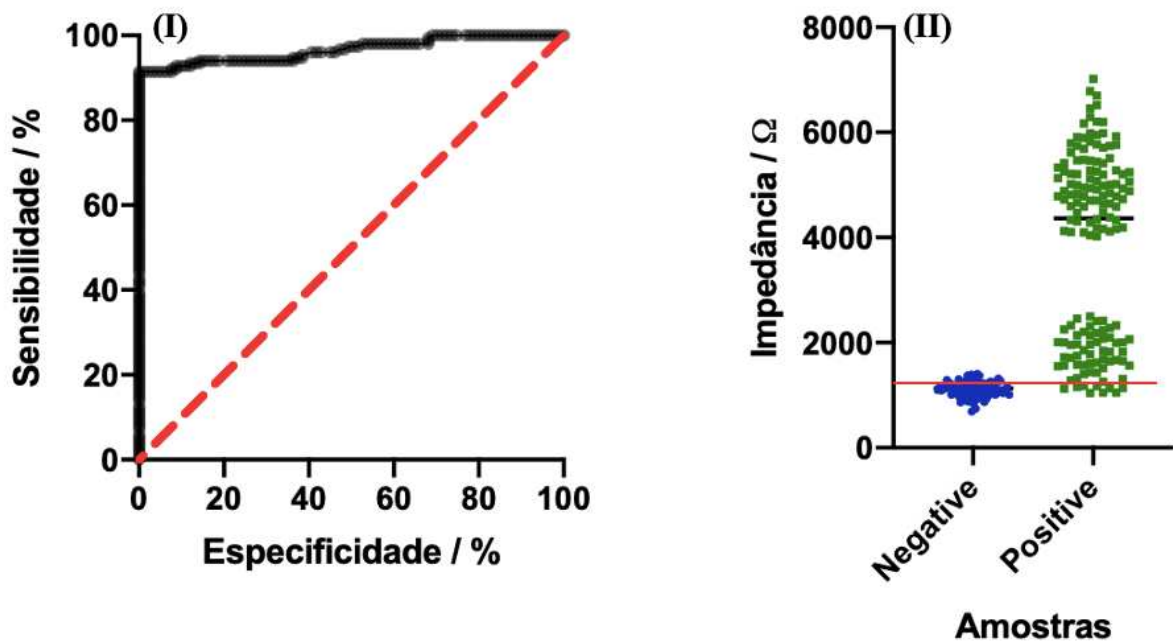
De acordo com a literatura, o caso ideal de uma curva ROC seria um perfil de sensibilidade versus especificidade com ângulo de 90 graus (OBUCHOWSKI; BULLEN, 2018), assim como o gráfico da Figura 21(I). Este perfil é observado apenas para conjuntos de dados sem falsos positivos ou negativos, como no caso deste modelo, para o qual todas as amostras foram previamente validadas pelo método comparativo ELISA. Observa-se que é extremamente trivial determinar o ponto de impedância para o qual ter-se-á 100% de sensibilidade e 100% de especificidade, o qual, nesse caso, corresponde a 4190 Ω . Deste modo, de acordo com a curva ROC construída, qualquer amostra que resulte em um valor de impedância superior a 4190 Ω , deve ser classificada como positiva para estrogiloidíase.

Contudo, conforme já citado acima, o conjunto de dados utilizado não continha nenhum falso positivo ou negativo, além de ter considerado amostras provenientes apenas de pacientes denominados imunocompetentes, ou seja, apresentam níveis normais de produção de anticorpos. Pacientes imunodeprimidos apresentam mecanismos de defesa contra infecções comprometidos, resultando em baixas taxas de produção de anticorpos. Entre esses pacientes se encontram receptores de implantes e transplantes, portadores do vírus da imunodeficiência humana e indivíduos com câncer (SHU KURIZKY et al., 2020).

A fim de avaliar a aplicabilidade do dispositivo proposto em amostras de pacientes imunodeprimidos com soro positivo para estrogiloidíase, a mesma curva ROC foi

construída, inserindo os valores de impedância de 60 amostras positivas provenientes desse grupo de pacientes. A Figura 22(I) apresenta a curva ROC construída considerando pacientes imunocompetentes e imunodeprimidos. A Figura 22(II) apresenta a distribuição gráfica dos pontos de impedância utilizados para construção da curva ROC.

Figura 22. (I) Curva ROC para determinação do *cutoff* de impedância e (II) Disposição gráfica dos pontos de impedância para amostras positivas e negativas de pacientes imunocompetentes e imunodeprimidos



Como pode ser observado, neste caso a curva não apresenta um perfil ideal, indicando que existem observações que fornecem resultados falso positivo ou negativo. Considerando o gráfico da Figura 22(II), verifica-se a ocorrência de resultados falso negativos para pacientes imunodeprimidos, com baixa concentração de anticorpos, o que resulta na não idealidade da curva. De acordo com o gráfico, o ponto de corte neste caso deve estar entre 1184 e 1367 Ω . Considerando que um resultado falso positivo é substancialmente mais prejudicial ao paciente, visto que a doença pode atingir outros órgãos vitais, como discutido anteriormente, deve estabelecer-se o *cutoff* de 1184 Ω , isto é, toda amostra que resulte em um valor de impedância igual ou superior a esse, deve ser classificada como positiva para *strongiloidíase*. Considerando o conjunto de dados utilizado para construção da curva, isto é, envolvendo pacientes imunocompetentes e imunodeprimidos, assumindo este valor de corte o

dispositivo imunossensor proposto fornece 9,6% de falsos positivos e apenas 1,25% de falsos negativos. A partir da análise das amostras de pacientes imunodeprimidos empregando o teste ELISA, obteve-se 17,8% de falsos negativos, um percentual superior a dez vezes o resultado obtido empregando-se o dispositivo imunossensor proposto.

Vale ressaltar que foram determinados dois valores de corte, um considerando apenas os valores de impedância para amostras de pacientes imunocompetentes (4190 Ω), resultando em 0% de falsos positivos ou negativos; e outro valor considerando os valores de impedância para pacientes imunodeprimidos (1184 Ω), resultando nos erros citados acima. A utilização deste segundo ponto de corte está condicionada a uma entrevista durante a triagem do paciente, analisando a possibilidade de tratar-se de um caso de imunodepressão com base no histórico e estado de saúde do paciente com sintomas da estrogiloidíase.

5 CONCLUSÕES

Considerando os resultados obtidos e os objetivos previamente estabelecidos, conclui-se que a dispersão de grafeno preparada utilizando CMB como polímero estabilizador, modificada com *quantum dots* de óxido de zinco, constituiu um material compósito de sucesso para amplificação dos sinais voltamétricos/impedimétricos, além de atuar como suporte para imobilização eletrostática do antígeno de estrogiloidíase.

As técnicas de VC e EIE em conjunto com o uso da sonda eletroquímica (sistema $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$) permitiram uma análise detalhada da contribuição de cada agente modificador utilizado na construção do dispositivo imunossensor projetado, certificando, inclusive, a imobilização eficiente do elemento de bioreconhecimento na superfície do EIC. Além dos procedimentos de caracterização, essas técnicas foram aplicadas com sucesso na análise de amostras reais de pacientes soro e sangue positivos e negativos para estrogiloidíase, considerando pacientes imunocompetentes e imunodeprimidos.

O tratamento multivariado dos dados, realizado usando análise discriminante por mínimos quadrados parciais, permitiu a classificação 100% correta das amostras de pacientes imunocompetentes com base nos perfis voltamétricos obtidos empregando o imunossensor desenvolvido, em plena concordância com os resultados obtidos empregando o teste imunológico padrão (ELISA). Utilizando pontos de corte estratégicos para medidas de EIE, pode-se classificar 100% corretamente pacientes positivos e negativos imunocompetentes, ou com possibilidade de se obter 9,6% de falso positivo e 1,25% falso negativo no caso de pacientes imunodeprimidos.

Finalmente, foi possível atestar a especificidade da interação antígeno-anticorpo na superfície do dispositivo projetado, com base na análise de amostras positivas para outras helmintíases. Além disso, o modelo de análise multivariada dos dados mostrou excelente seletividade, classificando corretamente 100% das amostras soro positivas para outras doenças, negativas para estrogiloidíase, assim como as medidas de EIE através da curva ROC.

REFERÊNCIAS

- AMADOR SALOMÃO, P. E. Produção e Aplicação de Biossensores: Uma Breve Revisão. **Research, Society and Development**, v. 7, n. 3, p. 1373282, 27 fev. 2018.
- ARENAS, C. B. et al. An electrochemical immunosensor for adiponectin using reduced graphene oxide–carboxymethylcellulose hybrid as electrode scaffold. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 223, p. 89–94, 1 fev. 2016.
- BATAILLARD, P. et al. Direct Detection of Immunospecies by Capacitance Measurements. **Analytical Chemistry**, v. 60, n. 21, p. 2374–2379, 1988.
- BERGER, C. E. H.; GREVE, J. Differential SPR immunosensing. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 63, n. 1, p. 103–108, 2000.
- BERGGREN, C.; BJARNASON, B.; JOHANSSON, G. Capacitive biosensors. **Electroanalysis**, v. 13, n. 3, p. 173–180, 2001.
- BIRD, A. F.; ZUCKERMAN, B. M. Studies on the surface coat (glycocalyx) of the dauer larva of *Angvina agrostis*. **International Journal for Parasitology**, v. 19, n. 3, p. 235–240, 1989.
- BRANDI, J. et al. Chemical modification of botryosphaeran: Structural characterization and anticoagulant activity of a water-soluble sulfonated (1→3)(1→6)- α -D-glucan. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 10, p. 1036–1042, 2011.
- BRERETON, R. G.; LLOYD, G. R. Partial least squares discriminant analysis: Taking the magic away. **Journal of Chemometrics**, v. 28, n. 4, p. 213–225, 2014.
- BRETT, C. M. A.; BRETT, A. M. O. **Electrochemistry: principles, methods, and applications**. 1. ed. Oxford: Oxford University Press Inc, 1993.
- CALIL, S. S.; ROBERTO, P. Biossensores: estrutura, funcionamento e aplicabilidade. **6ª Mostra de Produção Científica da Pós-Graduação Lato Sensu da PUC Goiás**, p. 1–20, 2011. Disponível em: <[http://www.cpgls.ucg.br/6mostra/artigos/SAUDE/SIMONE SAAD CALIL PAULO ROBERTO QUEIROZ.pdf](http://www.cpgls.ucg.br/6mostra/artigos/SAUDE/SIMONE_SAAD_CALIL_PAULO_ROBERTO_QUEIROZ.pdf)>.
- CAO, H. et al. Fecal metabolome profiling of liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma patients by ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 691, n. 1–2, p. 68–75, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2011.02.038>>.
- CAO, X. et al. Bimetallic AuPt nanochains: Synthesis and their application in electrochemical immunosensor for the detection of carcinoembryonic antigen. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 39, n. 1, p. 226–230, 2013.
- CHEN, Y. et al. Three dimensional sea-urchin-like PdAuCu nanocrystals/ferrocene-grafted-polylysine as an efficient probe to amplify the electrochemical signals for ultrasensitive immunoassay of carcinoembryonic antigen. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 132, n. February, p. 294–301, 2019a. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.02.057>>.

CHEN, Y. et al. A novel electrochemical immunosensor for highly sensitive detection of prostate-specific antigen using 3D open-structured PtCu nanoframes for signal amplification. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 126, n. October 2018, p. 187–192, 2019b. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.10.057>>.

CHEN, Y. et al. A novel electrochemical immunosensor for highly sensitive detection of prostate-specific antigen using 3D open-structured PtCu nanoframes for signal amplification. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 126, n. August 2018, p. 187–192, 2019c. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.10.057>>.

CINTI, S. et al. Screen-Printed Electrodes Modified with Carbon Nanomaterials: A Comparison among Carbon Black, Carbon Nanotubes and Graphene. **Electroanalysis**, v. 27, n. 9, p. 2230–2238, set. 2015.

COELHO, J. H. et al. Exploring the exocellular fungal biopolymer botryosphaeran for laccase-biosensor architecture and application to determine dopamine and spironolactone. **Talanta**, 2019.

CORRAL, M. A. et al. IMMUNODIAGNOSIS OF HUMAN STRONGYLOIDIASIS: USE OF SIX DIFFERENT ANTIGENIC FRACTIONS FROM *Strongyloides venezuelensis* PARASITIC FEMALES. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, n. 5, p. 427–430, 2015.

CORRAL, M. A. et al. Potential immunological markers for diagnosis of human strongyloidiasis using heterologous antigens. **Parasitology**, v. 144, n. 2, p. 124–130, 2017.

DAFALLA, A. A. The Indirect Fluorescent Antibody Test for the Sero-Diagnosis of Strongyloidiasis. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 75, n. 6, p. 109–111, 1972.

DANIELS, J. S.; POURMAND, N. Label-free impedance biosensors: Opportunities and challenges. **Electroanalysis**, v. 19, n. 12, p. 1239–1257, 2007.

DAVIES, T. J.; COMPTON, R. G. The cyclic and linear sweep voltammetry of regular and random arrays of microdisc electrodes: Theory. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 585, n. 1, p. 63–82, 2005.

DE ALMEIDA, S. V. et al. Cancer immunosensor based on apo and holo transferrin binding. **Microchimica Acta**, v. 187, n. 8, 2020.

DE OLIVEIRA, V. M. A. T. et al. Authentication of organic sugars by NIR spectroscopy and partial least squares with discriminant analysis. **Analytical Methods**, v. 12, n. 5, p. 701–705, 2020.

DEKKER, R. F. H. et al. Botryosphaeran -- A Fungal Exopolysaccharide of the (1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)- β -D-Glucan Kind: Structure and Biological Functions. In: COHEN, E.; MERZENDORFER, H. (Ed.). **Extracellular Sugar-Based Biopolymers Matrices**. Cham: Springer International Publishing, 2019. p. 433–484.

DREYER, G. et al. Patterns of detection of *Strongyloides stercoralis* in stool specimens: Implications for diagnosis and clinical trials. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 10, p. 2569–2571, 1996.

FARGHALY, O. A. et al. Analytical application using modern electrochemical techniques. **Int. J. Electrochem. Sci**, v. 9, p. 3287–3318, 2014.

FATIBELLO-FILHO, O.; CAPELATO, M. D. Biossensores. **Química Nova**, v. 15, n. 1, p. 28–39, 1992.

FUNG, Y. S.; WONG, Y. Y. Self-assembled monolayers as the coating in a quartz piezoelectric crystal immunosensor to detect Salmonella in aqueous solution. **Analytical Chemistry**, v. 73, n. 21, p. 5302–5309, 2001.

GAO, Z. et al. Ultrasensitive electrochemical immunosensor for quantitative detection of HBeAg using Au@Pd/MoS₂@MWCNTs nanocomposite as enzyme-mimetic labels. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 102, n. August 2017, p. 189–195, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.11.032>>.

GENTA, R. M. Predictive Value of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the Serodiagnosis of Strongyloidiasis. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 89, n. 3, p. 391–394, 1 mar. 1988. Disponível em: <<https://academic.oup.com/ajcp/article/89/3/391/1790857>>. Acesso em: 1 dez. 2020.

GOLOMSKI, W. A. American Society for Quality (ASQ). **Encyclopedia of Statistical Sciences**, v. 11, n. 1, p. 137–148, 2006.

GOMES, A. et al. Covalent attachment of laccase to carboxymethyl-botryosphaeran in aqueous solution for the construction of a voltammetric biosensor to quantify quercetin. **Bioelectrochemistry**, v. 135, p. 107543, out. 2020.

GOODING, J. J. Nanostructuring electrodes with carbon nanotubes: A review on electrochemistry and applications for sensing. **Electrochimica Acta**, v. 50, n. 15, p. 3049–3060, 2005.

GRIESHABER, D. et al. Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. **Sensors**, v. 8, n. 3, p. 1400–1458, 2008. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1424-8220/8/3/1400/>>.

GROMSKI, P. S. et al. A tutorial review: Metabolomics and partial least squares-discriminant analysis - a marriage of convenience or a shotgun wedding. **Analytica Chimica Acta**, v. 879, p. 10–23, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2015.02.012>>.

GROSSER, D. K. Cyclic Voltammetry. In: **Characterization of Materials**. [s.l.: s.n.]

GU, B. et al. ZnO quantum dot labeled immunosensor for carbohydrate antigen 19-9. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, n. 5, p. 2720–2723, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2010.09.031>>.

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

HEMBEN, A.; ASHLEY, J.; TOTHILL, I. E. Development of an Immunosensor for Pf HRP 2 as a biomarker for malaria detection. **Biosensors**, v. 7, n. 3, p. 28, 2017.

HIRANO, S. Western Blot Analysis. In: REINEKE, J. (Ed.). **Nanotoxicity: Methods and**

Protocols. Totowa, NJ: Humana Press, 2012. p. 87–97.

JANEGITZ, B. C. Desenvolvimento de biossensores utilizando nanotubos de carbono e nanopartículas de ouro. p. 1–149, 2012.

JIANG, Z. et al. A metabonomic approach applied to predict patients with cerebral infarction. **Talanta**, v. 84, n. 2, p. 298–304, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2011.01.015>>.

KALASAD, M. N.; BENDIGERI, D. Synthesis of Stable ZnO Quantum Dots by a Simple Hydrolysis and Condensation Method. **International Journal of Science, Engineering and Management (IJSEM)**, v. 3, n. 4, p. 263–265, 2018.

KAUSHIK, A. et al. A sensitive electrochemical immunosensor for label-free detection of Zika-virus protein. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 3–7, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-28035-3>>.

KAVOSI, B. et al. Ultrasensitive electrochemical immunosensor for PSA biomarker detection in prostate cancer cells using gold nanoparticles/PAMAM dendrimer loaded with enzyme linked aptamer as integrated triple signal amplification strategy. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 74, p. 915–923, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2015.07.064>>.

KHORSAND ZAK, A. et al. Synthesis and characterization of a narrow size distribution of zinc oxide nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, v. 6, n. 1, p. 1399–1403, 2011.

KUMAR, S. A.; CHEN, S. M. Nanostructured zinc oxide particles in chemically modified electrodes for biosensor applications. **Analytical Letters**, v. 41, n. 2, p. 141–158, 2008.

KURBANOGLU, S. et al. Electrochemically reduced graphene and iridium oxide nanoparticles for inhibition-based angiotensin-converting enzyme inhibitor detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 88, p. 122–129, 15 fev. 2017.

LAYQAH, L. A.; EISSA, S. An electrochemical immunosensor for the corona virus associated with the Middle East respiratory syndrome using an array of gold nanoparticle-modified carbon electrodes. **Microchimica Acta**, v. 186, n. 4, 2019.

LEE, L. C.; LIONG, C. Y.; JEMAIN, A. A. Partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) for classification of high-dimensional (HD) data: A review of contemporary practice strategies and knowledge gaps. **Analyst**, v. 143, n. 15, p. 3526–3539, 2018.

LI, J. et al. Electrochemical immunosensor based on graphene-polyaniline composites and carboxylated graphene oxide for estradiol detection. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 188, p. 99–105, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2013.06.082>>.

LIN, J.; JU, H. Electrochemical and chemiluminescent immunosensors for tumor markers. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 20, n. 8 SPEC. ISS., p. 1461–1470, 2005.

LIU, X. et al. An electrochemical biosensor for DNA detection based on tungsten disulfide/multi-walled carbon nanotube composites and hybridization chain reaction

amplification. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 235, p. 603–613, 1 nov. 2016.

LUNA, D. M. N. et al. Electrochemical immunosensor for dengue virus serotypes based on 4-mercaptobenzoic acid modified gold nanoparticles on self-assembled cysteine monolayers. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 220, p. 565–572, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2015.05.067>>.

LVOVICH, V. F.; WILEY INTERSCIENCE (ONLINE SERVICE). **Impedance spectroscopy: applications to electrochemical and dielectric phenomena**. [s.l.] Wiley, 2012.

MARSHALL, J. S. et al. An introduction to immunology and immunopathology. **Allergy, Asthma and Clinical Immunology**, v. 14, n. s2, p. 1–10, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13223-018-0278-1>>.

MARTINS, B. R. et al. Development of an electrochemical immunosensor for specific detection of visceral leishmaniasis using gold-modified screen-printed carbon electrodes. **Biosensors**, v. 10, n. 8, 2020.

MATTOS, G. J. et al. Laccase stabilized on β -D-glucan films on the surface of carbon black/gold nanoparticles: A new platform for electrochemical biosensing. **Bioelectrochemistry**, 11 maio 2019.

NESAKUMAR, N. et al. Electrochemical acetylcholinesterase biosensor based on ZnO nanocuboids modified platinum electrode for the detection of carbosulfan in rice. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 77, p. 1070–1077, 2016.

NESPECA, M. G. et al. Rapid and sensitive method for detecting adulterants in gasoline using ultra-fast gas chromatography and Partial Least Square Discriminant Analysis. **Fuel**, v. 215, n. November 2017, p. 204–211, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fuel.2017.11.032>>.

NUNES, K. M. et al. Raman spectroscopy and discriminant analysis applied to the detection of frauds in bovine meat by the addition of salts and carrageenan. **Microchemical Journal**, v. 147, n. March, p. 582–589, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.03.076>>.

OBUCHOWSKI, N. A.; BULLEN, J. A. Receiver operating characteristic (ROC) curves: review of methods with applications in diagnostic medicine. **Physics in Medicine & Biology**, v. 63, n. 7, p. 07TR01, 29 mar. 2018. Disponível em: <<https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1361-6560/aab4b1>>.

OLSEN, A. et al. Strongyloidiasis - the most neglected of the neglected tropical diseases? **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, n. 10, p. 967–972, 2009.

PEJCIC, B.; DE MARCO, R. **Impedance spectroscopy: Over 35 years of electrochemical sensor optimization** *Electrochimica Acta* Pergamon, , 15 set. 2006. .

PENG, D. et al. Electrochemical immunosensor for carcinoembryonic antigen based on signal amplification strategy of graphene and Fe₃O₄/Au NPs. **Journal of Electroanalytical**

Chemistry, v. 761, p. 112–117, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jelechem.2015.12.014>>.

PENN, S. G.; HE, L.; NATAN, M. J. Nanoparticles for bioanalysis. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 7, n. 5, p. 609–15, 2003.

PRITCHARD, D. I. et al. Antigen stripping from the nematode epicuticle using the cationic detergent cetyltrimethylammonium bromide (CTAB). **Parasite Immunology**, v. 7, n. 6, p. 575–585, 1985.

PRODROMIDIS, M. I. Impedimetric immunosensors-A review. **Electrochimica Acta**, v. 55, n. 14, p. 4227–4233, 2010.

REQUENA-MÉNDEZ, A. et al. The Laboratory Diagnosis and Follow Up of Strongyloidiasis: A Systematic Review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 1, 2013.

SASSOLAS, A.; BLUM, L. J.; LECA-BOUVIER, B. D. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 3, p. 489–511, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.09.003>>.

SATO, Y. et al. Gelatin particle indirect agglutination test for mass examination for strongyloidiasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 85, n. 4, p. 515–518, 1 jul. 1991. Disponível em: <[https://academic.oup.com/trstmh/article-lookup/doi/10.1016/0035-9203\(91\)90240-Y](https://academic.oup.com/trstmh/article-lookup/doi/10.1016/0035-9203(91)90240-Y)>. Acesso em: 1 dez. 2020.

SHU KURIZKY, P. et al. Opportunistic Tropical Infections in Immunosuppressed Patients. **Best practice & research. Clinical rheumatology**, v. 34, n. 4, p. 101509, ago. 2020.

SINAR, D.; KNOPF, G. K. Cyclic Liquid-Phase Exfoliation of Electrically Conductive Graphene-Derivative Inks. **IEEE Transactions on Nanotechnology**, v. 17, n. 5, p. 1020–1028, set. 2018. Disponível em: <<https://ieeexplore.ieee.org/document/8390481/>>. Acesso em: 9 set. 2019.

SONG, Y. et al. First use of inorganic copper silicate-transduced enzyme-free electrochemical immunosensor for carcinoembryonic antigen detection. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 319, n. May, p. 128311, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.128311>>.

SRIPRACHUABWONG, C. et al. Inkjet-printed graphene-PEDOT:PSS modified screen printed carbon electrode for biochemical sensing. **Journal of Materials Chemistry**, v. 22, n. 12, p. 5478–5485, 2012.

TAKARA, E. A. et al. Novel electrochemical sensing platform based on a nanocomposite of PVA/PVP/RGO applied to IgG anti- *Toxoplasma gondii* antibodies quantitation. **Talanta**, v. 195, n. August 2018, p. 699–705, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.11.070>>.

TALARICO, D. et al. Carbon black as successful screen-printed electrode modifier for phenolic compound detection. **Electrochemistry Communications**, v. 60, p. 78–82, 1 nov. 2015.

TALEAT, Z. et al. CA125 Immunosensor Based on Poly-Anthranilic Acid Modified Screen-Printed Electrodes. **Electroanalysis**, v. 25, n. 1, p. 269–277, 2013.

TOLESSA, K. et al. Prediction of specialty coffee cup quality based on near infrared spectra of green coffee beans. **Talanta**, v. 150, p. 367–374, 2016.

TORMENA, C. D. et al. Potential biomonitoring of atmospheric carbon dioxide in Coffea arabica leaves using near-infrared spectroscopy and partial least squares discriminant analysis. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 29, p. 30356–30364, 2019.

TURNER, A. P. F. Biosensors: sense and sensibility. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 8, p. 3184, 21 abr. 2013.

UMAR, A. et al. Development of Highly Sensitive and Selective Cholesterol Biosensor Based on Cholesterol Oxidase Co-Immobilized with α -Fe₂O₃ Micro-Pine Shaped Hierarchical Structures. **Electrochimica Acta**, v. 135, p. 396–403, 20 jul. 2014.

VAN DOORN, H. R. et al. Use of enzyme-linked immunosorbent assay and dipstick assay for detection of Strongyloides stercoralis infection in humans. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 438–442, 2007.

VICENTINI, F. C. **Desenvolvimento de biossensores à base de filmes poliméricos, nanotubos de carbono e nanopartículas de ouro**. 2013. Universidade Federal de São Carlos, 2013.

VINICIUS FOGUEL, M. et al. Amperometric immunosensor for Chagas' disease using gold CD-R Transducer. **Electroanalysis**, v. 23, n. 11, p. 2555–2561, 2011.

WANG, L. et al. Amperometric glucose biosensor based on silver nanowires and glucose oxidase. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 176, p. 9–14, jan. 2013.

WANG, X. et al. An ultrasensitive electrochemical immunosensor based on the catalytic activity of MoS₂-Au composite using Ag nanospheres as labels. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 206, p. 30–36, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2014.09.028>>.

WANG, Z. et al. 1H NMR-based metabolomic analysis for identifying serum biomarkers to evaluate methotrexate treatment in patients with early rheumatoid arthritis. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 4, n. 1, p. 165–171, 2012.

WHO | Strongyloidiasis. **WHO**, 2016. Disponível em: <https://www.who.int/intestinal_worms/epidemiology/strongyloidiasis/en/#.YB6dWHN2alg.mendeley>. Acesso em: 6 fev. 2021.

YANG, Y. et al. An ultrasensitive sandwich-type electrochemical immunosensor based on the signal amplification strategy of echinoidea-shaped Au@Ag-Cu₂O nanoparticles for prostate specific antigen detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 99, p. 450–457, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2017.08.018>>.

YU, Y. et al. The design of TiO₂ nanostructures (nanoparticle, nanotube, and nanosheet) and their photocatalytic activity. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 118, n. 24, p. 12727–

12733, jun. 2014.

ZHANG, Y.-Q. et al. N-doped carbon quantum dots for TiO₂-based photocatalysts and dye-sensitized solar cells. **Nano Energy**, v. 2, n. 5, p. 545–552, 2013.

ZHOU, J. et al. An ultrasensitive electrochemical immunosensor for carcinoembryonic antigen detection based on staphylococcal protein A - Au nanoparticle modified gold electrode. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 197, p. 220–227, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2014.02.009>>.