

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**DESENVOLVIMENTO DE SENSORES ELETROQUÍMICOS
PARA DIAGNÓSTICO DE INFECÇÕES FÚNGICAS**

Pedro Luis Gallo Junior*

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIAS, área de concentração: QUÍMICA ANALÍTICA.

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria

*** Bolsista CNPq**

São Carlos – SP

2025



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Pedro Luis Gallo Júnior, realizada em 26/09/2025.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria (UFSCar)

Prof. Dr. Cleber Antonio Lindino (UNIOESTE - Campus Toledo)

Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha (UFSCar)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Química.

DEDICATORIA

À minha mãe, Adriana e meus amigos queridos, obrigado por me incentivaram a chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

A jornada até aqui foi repleta de desafios, aprendizados e crescimento, e muitas pessoas foram fundamentais nesse processo.

Agradeço, em primeiro lugar, ao meu orientador Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria, pela orientação atenta, pela paciência e pelos valiosos ensinamentos compartilhados ao longo de todo o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores e colegas do programa de pós-graduação, por cada contribuição, troca de conhecimento e apoio durante a trajetória acadêmica.

À equipe do laboratório de Bioanalítica e Eletroanalítica (LABiE), pelo suporte técnico e científico que possibilitou a realização deste projeto.

Aos amigos e familiares, pelo encorajamento constante, pela escuta nos momentos difíceis e pela presença que, mesmo à distância, nunca deixou de ser sentida. Principalmente a minha mãe, Adriana por sempre me apoiar e incentivar ao longo da minha trajetória. Sem o amor, apoio e sacrifícios de vocês, nada disso seria possível.

À coordenação e secretaria de Pós-Graduação em Química da UFSCar (PPGQ), sempre dispostos a ajudar quando solicitados.

Aos membros da banca pela disponibilidade e contribuições para o trabalho.

À Universidade Federal de São Carlos e ao Departamento de Química pela estrutura fornecida para realização deste trabalho.

A todos os órgãos de fomento, em especial a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela bolsa concedida (CNPq), pela bolsa concedida.

Este trabalho é resultado do esforço coletivo de todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para sua concretização. A cada um, meu sincero agradecimento.

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Ampére
Abs	Absorbância
Ac	Anticorpo
ALP	Fosfatase alcalina (do inglês alkaline phosphatase)
ANOVA	Análise de variância
AuNPs	Nanopartículas de ouro
C	Concentração
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio padrão
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática (do inglês Enzyme linked immunosorbent assay)
Ep	Potencial de pico
EpOx	Potencial de pico de oxidação
EpRed	Potencial de pico de redução
Et-NH ₂	Etanolamina
FMA	Ácido ferroceno monocarboxílico
g	Gramma
I	Corrente
I _p	Corrente de pico
I _p Ox	Corrente de pico de oxidação
I _p Red	Corrente de pico de redução
L	Litro
m	Massa
MES	Ácido 2-N-morfolinoetanossulfônico
NaBH ₄	Borohidreto de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NHS	N-hidroxisuccinimida
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão fosfato salino (do inglês Phosphate buffer saline)

PCR	Reação de cadeia em polimerase (do inglês Polymerase Chain Reaction)
PM	Partículas magnéticas
SPCE	Eletrodos de carbono serigrafados (do inglês Screen-printed carbono electrodes)
TF	Tampão fosfato
Tw	Tween® 20
UV-Vis	Espectroscopia no ultravioleta visível
ΔF	Relação amostra-branco
λ	Comprimento de onda
DPV	Voltametria de Pulso Diferencial (do inglês, Differential Pulse Voltametry)

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1 - Composição da parede celular de fungos: componentes estruturais, respectivas funções biológicas e porcentagens relativas em leveduras e formas filamentosas.	3
TABELA 1.2 - Incidência, principais agentes e taxas de mortalidade associadas às infecções fúngicas(IFs) em diferentes grupos de risco.....	8
TABELA 3.1 -Variáveis reais de acordo utilizados no planejamento e os respectivos níveis codificados.	45
TABELA 3.2 - Experimento do planejamento PCC com as variáveis codificadas.	45
TABELA 4.1 - Resultados experimentais do planejamento para as variáveis: a concentração de PMs a serem modificadas (C_{PMs} , variável 1), a concentração de anticorpo a ser imobilizada na superfície das PMs ($C_{Anticorpo-PMs}$, variável 2), Concentração de AuNPs a serem modificadas (C_{AuNPs} , variável 3), a concentração de anticorpo a ser imobilizada na superfície das AuNPs ($C_{Anticorpo-AuNPs}$, variável 4), o tempo de incubação entre o bioconjugado PMs-mAb com Ch (Tempo da 1° incubação, variável 5), o tempo de incubação entre o bioconjugado PMs-mAb/Ch com AuNPs-mAb, formando o bioconjugado final. (Tempo da 2° incubação, variável 6) entre o branco a amostra ($-ΔI$).....	56

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1.1 - (A) Diagrama esquemático da parede celular fúngica, evidenciando suas três camadas principais (externa, intermediária e interna) e conformação molecular da quitina (B).....	4
FIGURA 1.1.2- Resumo das funções ecológicas e usos biotecnológicos dos fungos.....	5
FIGURA 1.1.3 - Imagens histológicas evidenciando a morfologia típica de leveduras em tecidos infectados, corados com Grocott-Gomori (GMS) nas espécies A, B e C, e Fontana-Masson na espécie D.	11
FIGURA 1.1.4 - Estrutura de um anticorpo composto por cadeias leves e pesadas e fragmentos.....	14
FIGURA 1.1.5 - Esquema do imunoensaio do tipo Direto.	15
FIGURA 1.1.6 - Esquema do imunoensaio do tipo Indireto.....	15
FIGURA 1.1.7 - Esquema do imunoensaio competitivo direto com a) antígenos imobilizados e anticorpo marcado e b) anticorpo imobilizado e o antígeno marcado. c) Esquema do imunoensaio competitivo indireto com antígenos imobilizados e anticorpo secundário marcado.....	16
FIGURA 1.1.8 - Esquema do imunoensaio do tipo sanduíche.	17
FIGURA 1.1.9- SPEs em diferentes formatos e em arranjos de oito eletrodos para aplicações simultâneas. Sendo: (A) Célula unitária completa, (B) arranjo de oito células eletroquímicas completas, (C) arranjo contendo oito eletrodos de trabalho e (D) arranjo contendo os eletrodos de referência e contra eletrodo.....	22
FIGURA 1.1.10 - Representação das PMs funcionalizadas e modificadas com diferentes materiais.	24
FIGURA 3.5.1- Etapas envolvidas na síntese das AuNPs: A) Aquecimento sob agitação até ebulição. B) Adição da solução de citrato de sódio. C) Interrupção do aquecimento e formação das AuNPs.	35
FIGURA 3.6.1 - Representação esquemática da fabricação dos SEDs com as seguintes etapas: Recorte do adesivo de baixa aderência; Serigrafia dos eletrodos com tinta de carbono; Pintura dos REs utilizando tinta de Ag/AgCl; Remoção do adesivo; Adição de máscara; Aquecimento do SED em prensa térmica; Adição de ímãs de neodímio na parte de trás dos WEs.....	36
FIGURA 3.7.1 - Imobilização do anticorpo nas AuNPs utilizando EDC/NHS	37

FIGURA 3.7.2 – Etapas envolvidas na Formação AuNPs: Adição EDC/NHS; Incubação; Lavagem; Adição do Anticorpo; Incubação de 18 horas; lavagem; e bloqueio com ETA e BSA.	38
FIGURA 3.8.1 - Fotografia do separador magnético utilizado na bioconjugação das PMs.	39
FIGURA 3.8.2 - Etapas envolvidas na Formação AuNPs: Adição EDC/NHS; Incubação; Lavagem; Adição do Anticorpo; Incubação de 18 horas; lavagem; e bloqueio com ETA e BSA.	39
FIGURA 3.10.1 - Etapas envolvidas na etapa de captura, na formação do biconjugado PMS-mAb/Ch.	41
FIGURA 3.10.2 - Etapas envolvidas na etapa de detecção, na formação do biconjugado PMS-mAb/Ch/mAb-AuNPs.	41
FIGURA 3.12.1 - Foto do sistema eletroquímico utilizado para a detecção de quitina utilizando o SED.	43
FIGURA 4.1.1 – A) Voltamogramas cíclicos obtidos, contendo FMA (1,0 mmol L ⁻¹) em solução aquosa 0,5 mol L ⁻¹ KCl (pH 8,0) usando arranjo SPCE com 8 células independentes com velocidades de varredura variando de 10 a 300 mV s ⁻¹ . B) corrente de pico anódica vs. v ^{1/2}	49
FIGURA 4.2.1 - Estudo de repetibilidade intradispositivo com uma solução padrão de ácido ferroceno monocarboxílico 1,0 mmol L ⁻¹ preparada em KCl 0,5 mol L ⁻¹	51
FIGURA 4.2.2 - Estudo de repetibilidade intradia com uma solução padrão de ácido ferroceno monocarboxílico 1,0 mmol L ⁻¹ preparada em KCl 0,5 mol L ⁻¹	52
FIGURA 4.2.3 - Estudo de repetibilidade interdias com uma solução padrão de ácido ferroceno monocarboxílico 1,0 mmol L ⁻¹ preparada em KCl 0,5 mol L ⁻¹	53
FIGURA 4.3.1- Representação do processo de oxirredução das AuNPs e as curvas DPV obtidas a partir da aplicação do bioconjugado.	54
FIGURA 4.4.1- Resposta do magneto-imunoensaio de duas soluções de quitina em pH de 4 a 9.	55
FIGURA 4.5.1.1 - Significância dos efeitos referentes as variáveis a concentração de PMs a serem modificadas (CPMs, variável 1), a concentração de anticorpo a ser imobilizada na superfície das PMs (CAnticorpo-PMs, variável 2),	

Concentração de AuNPs a serem modificadas (CAuNPs, variável 3), a concentração de anticorpo a ser imobilizada na superfície das AuNPs (CAnticorpo-AuNPs, variável 4), o tempo de incubação entre o bioconjugado PMS-mAb com Ch (Tempo da 1° incubação, variável 5), o tempo de incubação entre o bioconjugado PMS-mAb/Ch com AuNPs-mAb, formando o bioconjugado final. (Tempo da 2° incubação, variável 6). .59

FIGURA 4.5.1.2 - Gráfico de probabilidade dos efeitos pela magnitude dos efeitos referentes as variáveis a concentração de PMS a serem modificadas (CPMS, variável 1), a concentração de anticorpo a ser imobilizada na superfície das PMS (CAnticorpo-PMS, variável 2), Concentração de AuNPs a serem modificadas (CAuNPs, variável 3), a concentração de anticorpo a ser imobilizada na superfície das AuNPs (CAnticorpo-AuNPs, variável 4), o tempo de incubação entre o bioconjugado PMS-mAb com Ch (Tempo da 1° incubação, variável 5), o tempo de incubação entre o bioconjugado PMS-mAb/Ch com AuNPs-mAb, formando o bioconjugado final. (Tempo da 2° incubação, variável 6).60

FIGURA 4.5.1.3 - Significância dos efeitos referentes as variáveis a concentração de anticorpo a ser imobilizada na superfície das AuNPs (CAnticorpo-AuNPs, variável 4), o tempo de incubação entre o bioconjugado PMS-mAb com Ch (Tempo da 1° incubação, variável 5), o tempo de incubação entre o bioconjugado PMS-mAb/Ch com AuNPs-mAb, formando o bioconjugado final. (Tempo da 2° incubação, variável 6).61

FIGURA 4.5.1.4 - Gráfico de probabilidade dos efeitos pela magnitude dos efeitos das variáveis a concentração de anticorpo a ser imobilizada na superfície das AuNPs (CAnticorpo-AuNPs, variável 4), o tempo de incubação entre o bioconjugado PMS-mAb com Ch (Tempo da 1° incubação, variável 5), o tempo de incubação entre o bioconjugado PMS-mAb/Ch com AuNPs-mAb, formando o bioconjugado final. (Tempo da 2° incubação, variável 6).62

FIGURA 4.5.1.5 - Gráficos de contorno referentes ao planejamento fatorial 2³ relacionando as variáveis 4,5 e 6.63

FIGURA 4.5.1.6 - Gráficos de superfície referentes ao planejamento fatorial 2³ relacionando as variáveis 4,5 e 6.63

FIGURA 4.5.2.1- Resultados de pico de redução de Au(III) de acordo com bloqueio de BSA, ETA e BSA+ETA em nanopartículas magnéticas(PMS) e nanopartículas de ouro (AuNPS). A) Bloqueio de AuNPS em BSA, ETA e BSA+ETA em reação com PMS bloqueado com BSA para formação do bioconjugado; B)

Bloqueio de AuNPS em BSA, ETA e BSA+ETA em reação com PMS bloqueado com ETA para formação do bioconjugado; C) Bloqueio de AuNPS em BSA, ETA e BSA+ETA em reação com PMS bloqueado com BSA+ETA para formação do bioconjugado; D) Bloqueio de PMs em BSA, ETA e BSA+ETA em reação com AuNPS bloqueado com BSA para formação do bioconjugado; E) Bloqueio de PMs em BSA, ETA e BSA+ETA em reação com AuNPS bloqueado com ETA para formação do bioconjugado; F) Bloqueio de PMs em BSA, ETA e BSA+ETA em reação com AuNPS bloqueado com BSA+ETA para formação do bioconjugado.65

FIGURA 4.5.2.2 - Resultados do pico de redução do ouro em diferentes bloqueios (BSA, ETA, BSA+ETA) nas nanopartículas de ouro e nanopartículas magnéticas (PMS).66

FIGURA 4.6.1 - Valores do pico anóptico em variação de concentração de quitina.67

FIGURA 4.7.1 - Valores de corrente de pico para a redução do Au(III) para diferentes grupos de leveduras em diferentes concentrações *Saccharomyces* $4 \cdot 10^4$ cell mL⁻¹; FV1 $5 \cdot 10^7$ cell mL⁻¹; FV3_13 $1 \cdot 10^8$ cell mL⁻¹; FV3_10 $7 \cdot 10^7$ cell mL⁻¹.68

FIGURA 4.7.2 - Comparação da resposta eletroquímica entre células de levedura intactas e lisado celular da mesma espécie, em concentrações semelhantes.69

FIGURA 4.8.1 - Valores do pico anóptico em variação de concentração de levedura do tipo *Saccharomyces*.70

RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE SENSORES ELETROQUÍMICOS PARA DIAGNÓSTICO DE INFECÇÕES FÚNGICAS. Infecções fúngicas, como as causadas por *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Pneumocystis jirovecii* e *Cryptococcus neoformans*, são responsáveis por milhões de mortes anuais, sobretudo em regiões tropicais e subtropicais. O número de indivíduos imunocomprometidos, como pacientes com câncer, transplantados, pessoas vivendo com HIV/AIDS ou internados em UTIs, tem aumentado globalmente, ampliando significativamente o público vulnerável a essas infecções. O diagnóstico precoce, no entanto, permanece um desafio clínico devido à ausência de sinais e sintomas específicos nos estágios iniciais, tornando os métodos laboratoriais essenciais para reduzir a morbimortalidade. As técnicas convencionais, como microscopia óptica, histopatologia, cultivo fúngico e PCR, frequentemente exigem combinação para alcançar alta precisão. Neste cenário, este trabalho propõe o desenvolvimento de um magneto-imunoensaio eletroquímico para detecção de fungos em amostras de soro humano. Anticorpos anti-quitina-oligômero, fornecidos pela FIOCRUZ-Manguinhos, foram utilizados como biorreceptores específicos da quitina, componente estrutural da parede celular fúngica. Esses anticorpos foram imobilizados em partículas magnéticas (Ab/PM) para captura seletiva e em nanopartículas de ouro (Ab/AuNPs) para amplificação do sinal eletroquímico. A plataforma desenvolvida visa oferecer uma alternativa sensível, rápida e adaptável ao diagnóstico point-of-care, especialmente em contextos com recursos limitados.

Palavras-chave: Sensor eletroquímico; Diagnóstico de infecções fúngicas; Nanopartículas de ouro.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF ELECTROCHEMICAL SENSORS FOR THE DIAGNOSIS OF FUNGAL INFECTIONS. Fungal infections, such as those caused by *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Pneumocystis jirovecii*, and *Cryptococcus neoformans*, are responsible for millions of deaths each year, especially in tropical and subtropical regions. The global increase in the number of immunocompromised individuals, including cancer patients, transplant recipients, people living with HIV/AIDS, and ICU patients, has significantly expanded the population vulnerable to these infections. Early diagnosis, however, remains a clinical challenge due to the lack of specific signs and symptoms in the initial stages, making laboratory methods essential to reducing morbidity and mortality. Conventional techniques such as optical microscopy, histopathology, fungal culture, and PCR often need to be combined to achieve high accuracy. In this context, this work proposes the development of an electrochemical magneto-immunoassay for the detection of fungi in human serum samples. Anti-chito-oligomer antibodies, provided by FIOCRUZ-Manguinhos, were used as specific bioreceptors for chitin, a structural component of the fungal cell wall. These antibodies were immobilized onto magnetic particles (Ab/MPs) for selective capture and onto gold nanoparticles (Ab/AuNPs) for signal amplification. The developed platform aims to provide a sensitive, rapid, and adaptable alternative for point-of-care diagnosis, especially in resource-limited settings.

Keywords: Electrochemical sensor; Fungal infection diagnosis; Gold nanoparticles.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	2
1.1. Fungos e Sua Relevância Biológica	2
1.2. Infecção Fúngica: Desafio Clínico	6
1.3. Sintomas e Complicações	8
1.4. Diagnostico de Infecções fúngicas, Métodos Tradicionais e Limitações .	10
1.5. Fundamentos e Aplicações dos Imunoensaios e Imunossensores	13
1.5.1. Imunoensaios	13
1.5.2. Imunossensores	17
1.5.3. Imunoensaios no Diagnóstico de Infecções Fúngicas Invasivas	19
1.6. Tecnologias Emergentes em Imunoensaios	20
1.6.1. Dispositivos Eletroquímicos (SEDs)	20
1.7. Nanomateriais: Partículas Magnéticas e Nanopartículas de Ouro	23
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVO	27
2.1. Justificativa	27
2.2. Objetivo Geral	27
2.3. Objetivos Específicos	27
3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	31
3.1. Reagentes e Soluções	31
3.1.1. Reagentes	31
3.1.2. Soluções	31
3.2. Instrumento e Materiais	31
3.2.1. Equipamentos	31
3.2.2. Material	32
3.3. Preparo de Amostra	32
3.3.1. Leveduras	32
3.3.2. Determinação da Concentração Celular	32
3.3.2.1. Método por Espectrofotometria UV-Vis	33

3.3.2.2. Método por Contagem Direta em Câmara de Neubauer	33
3.3.3. Congelamento de leveduras	34
3.3.4. Quitina	34
3.3.5. Lisado celular	34
3.3.6. Anticorpo anti-quitina-oligômeros (mAb)	34
3.4. Síntese das nanopartículas de ouro estabilizadas com citrato (AuNPs)	35
3.5. Construção Dos Eletrodos Descartáveis (SPEs)	35
3.6. Conjugação das AuNPs com o anticorpo anti-quitina-oligômeros (mAb)	37
3.7. Conjugação das PMs com o anticorpo anti-quitina-oligômeros (mAb)	38
3.8. Variação de bloqueio	39
3.9. Magneto-imunoensaio para determinação de quitina	40
3.10. Estudo de repetibilidade	42
3.11. Medidas eletroquímicas com os SPCE	42
3.12. Planejamento Fatorial	43
4. Resultado e discussão	49
4.1. Caracterização eletroquímica do SPEs	49
4.2. Precisão e Repetibilidade do SPCE	50
4.3. Estudos eletroquímicos preliminares com as AuNPs sintéticos	53
4.4. Detecção eletroquímica da quitina	54
4.5. Otimização Magneto-imunoensaio	56
4.5.1. Planejamento fatorial PCC	56
4.5.2. Estudo da etapa de bloqueio	64
4.6. Construção da curva analítica	66
4.7. Efeito do magneto-imunoensaio em leveduras de fungos	67
4.8. Construção da curva analítica com leveduras	69
5. CONCLUSÕES	72
6. REFERENCIAS	73

CAPÍTULO 1

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Fungos e Sua Relevância Biológica

Os fungos, organismos eucarióticos do reino Fungi, apresentam características biológicas e ecológicas bem distintas das encontradas em plantas e animais. Estão praticamente em toda parte: no solo, na água, em organismos vivos e também em matéria em decomposição, esses microrganismos exibem uma impressionante diversidade morfológica e fisiológica¹. Enquanto leveduras como *Saccharomyces cerevisiae* representam formas unicelulares, outras desenvolvem estruturas filamentosas complexas, formando extensas redes de micélio, que, em alguns casos, podem se espalhar por áreas equivalentes a vários campos de futebol². Apesar de mais de 150.000 espécies já terem sido catalogadas, estima-se que este número represente apenas 3-8% da diversidade fúngica real^{1,3}.

Boa parte dessa habilidade de colonizar os mais diversos ambientes vem de adaptações estruturais bastante eficientes. Nos fungos filamentosos, por exemplo, as hifas, que são suas unidades básicas, crescem por alongamento na ponta e por ramificação, formando redes que exploram o substrato com grande eficácia^{4,5}. Essas hifas podem apresentar divisões internas, como nas formas septadas, ou serem contínuas e multinucleadas, como as cenocíticas⁵. Para se dispersarem, muitos fungos produzem esporos especializados. Um exemplo notável é o *Aspergillus fumigatus*, capaz de gerar até 1 milhão de conídios por centímetro quadrado de micélio — todos com melanina, o que garante resistência à radiação ultravioleta⁶⁻⁹.

Ao contrário das plantas, os fungos não realizam fotossíntese: são heterotróficos obrigatórios e obtêm seus nutrientes absorvendo compostos orgânicos. Essa característica os torna peças-chave nos ciclos biogeoquímicos, com espécies que vão desde as que decompõem lignina, como *Phanerochaete chrysosporium*, até aquelas que degradam hidrocarbonetos de petróleo, como *Pestalotiopsis microspora*¹⁰. Sua versatilidade metabólica também permite que sobrevivam em condições extremas desde geleiras antárticas (*Cryomyces antarcticus*) até fontes termais (*Aspergillus terreus*), o que mostra sua incrível capacidade de adaptação a variações de temperatura, acidez e disponibilidade de água^{11,12}.

Outro aspecto importante na biologia dos fungos é a estrutura de sua parede celular, essencial tanto para manter sua forma quanto para protegê-los e interagir com o ambiente. De maneira geral, essa parede é composta por três camadas principais: externa, intermediária e interna. Na TABELA 1.1, é apresentada a proporção estimada dos principais componentes da parede celular fúngica, juntamente com suas respectivas funções biológicas¹³⁻¹⁵.

A camada mais externa, em algumas espécies, pode apresentar um glicocálix, uma matriz amorfa formada por glicoproteínas e polissacarídeos. Essa estrutura está associada a funções importantes, como aderência ao hospedeiro, evasão do sistema imune, reconhecimento por receptores celulares e proteção contra a dessecação. No entanto, é mais comum em fungos patogênicos e não está presente em todas as espécies^{16,17}.

Já a camada intermediária é rica em β -glucanas, especialmente nas formas β -(1,3) e β -(1,6), que são interligadas por proteínas glicosiladas. Juntas, essas moléculas formam uma rede tridimensional que conecta as demais camadas e confere elasticidade e resistência à parede celular¹⁵.

Por fim, a camada interna funciona como um verdadeiro esqueleto da célula fúngica. É formada principalmente por quitina, além de glucanos β -1,3 e β -1,6, e é responsável pela rigidez estrutural e suporte mecânico da célula¹⁵.

TABELA 1.1 - Composição da parede celular de fungos: componentes estruturais, respectivas funções biológicas e porcentagens relativas em leveduras e formas filamentosas.

Componente	Função	% na Parede celular	
		Leveduras	Filamentosos
Quitina	Resistência mecânica	1-2%	10-20%
β -Glucanas	Estrutura primária	50-60%	30-50%
Manoproteínas	Interação com hospedeiro	30-40%	10-20%
Melanina (em alguns fungos)	Proteção contra UV/oxidantes	Variável	

Fonte: O autor.

A Figura 1.1 ilustra, na parte A, a organização da parede celular fúngica, com destaque para suas camadas estruturais. Já na parte B, observa-se a representação molecular da quitina, um dos principais componentes dessa parede.

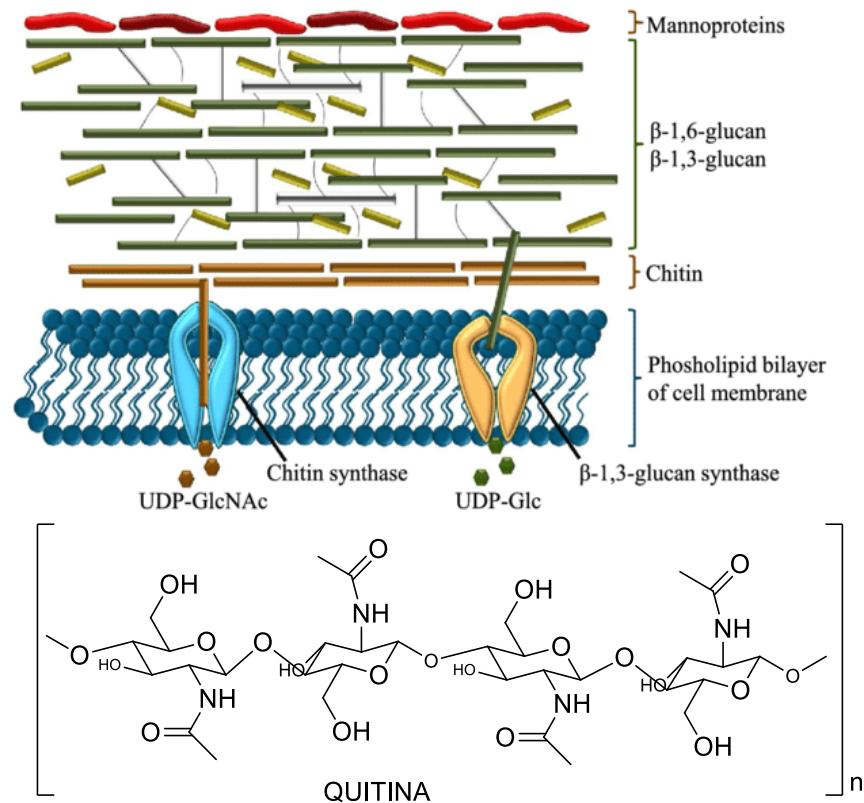


FIGURA 1.1 - (A) Diagrama esquemático da parede celular fúngica, evidenciando suas três camadas principais (externa, intermediária e interna) e conformação molecular da quitina (B)

Fonte: Fesel e Zuccaro¹⁸.

Os fungos desempenham um papel essencial no equilíbrio dos ecossistemas e têm se mostrado extremamente úteis no campo da biotecnologia, contribuindo de maneira significativa para a sociedade e o meio ambiente, conforme ilustrado na FIGURA 1.2. Na natureza, atuam como os principais responsáveis pela decomposição da matéria orgânica, reciclando cerca de 90% da biomassa vegetal morta. Esse processo é fundamental para os ciclos biogeoquímicos, especialmente os de carbono e nitrogênio, e garante a manutenção da fertilidade do solo¹⁹.

Importância dos Fungos: Ecologia e Biotecnologia

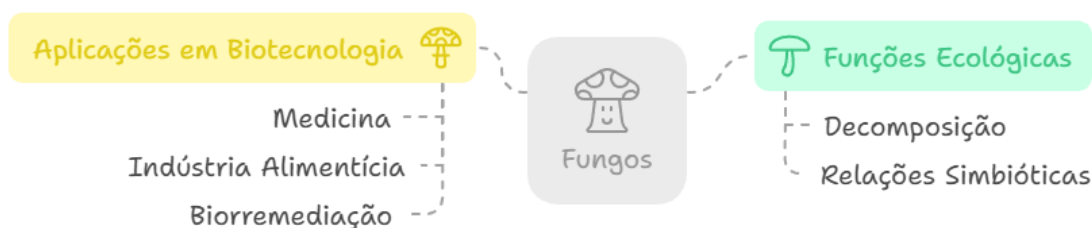


FIGURA 1.2- Resumo das funções ecológicas e usos biotecnológicos dos fungos.

Fonte: O Autor.

Além disso, muitos fungos vivem em parceria com outros seres vivos, formando relações simbióticas benéficas. Um exemplo clássico são as micorrizas, associações entre fungos e raízes de plantas, que melhoram bastante a absorção de água e nutrientes, como fósforo e nitrogênio, beneficiando cerca de 80% das espécies vegetais²⁰. Outro exemplo é o dos líquens, formados pela simbiose entre fungos e organismos fotossintetizantes, como algas verdes ou cianobactérias²¹.

No campo da biotecnologia, os fungos também têm grande destaque em diversas aplicações. Na medicina, por exemplo, são fonte de compostos fundamentais: a penicilina, derivada de *Penicillium chrysogenum*, revolucionou o tratamento de infecções bacterianas e estima-se que salve cerca de 200 milhões de vidas anualmente²². Outro exemplo é a ciclosporina, produzida por fungos do gênero *Tolypocladium*, essencial na medicina moderna por permitir o sucesso de transplantes de órgãos, ao inibir a rejeição imunológica²³.

Na indústria alimentícia, os fungos também são muito valiosos. Espécies como *Saccharomyces cerevisiae* são amplamente utilizadas na produção de pães, cervejas e vinhos, um setor que movimenta aproximadamente 850 bilhões de dólares por ano no mundo²⁴. Outros fungos, como *Penicillium roqueforti*, são usados na produção de queijos especiais, dando aroma, sabor e textura únicos que os tornam muito valorizados no mercado.

Outro campo promissor é o da biorremediação, que é o uso de organismos para limpar o meio ambiente. Algumas espécies, como *Phanerochaete chrysosporium*, possuem enzimas capazes de degradar compostos orgânicos complexos e poluentes persistentes, como hidrocarbonetos e pesticidas. Em determinadas condições, esses fungos podem atingir até 80% de eficiência na

descontaminação de ambientes, tornando-se uma alternativa sustentável e eficaz para recuperação de áreas degradadas¹⁰.

Diante de tamanha versatilidade, os fungos se mostram como organismos de grande importância científica. Seu potencial vai desde a promoção da sustentabilidade ambiental até o desenvolvimento de soluções inovadoras nas áreas da saúde e da indústria, reafirmando seu valor como ferramentas biotecnológicas de alto impacto.

Por outro lado, é importante considerar que nem todos os fungos são inofensivos. Muitos apresentam risco à saúde humana e são classificados conforme sua capacidade de causar doenças. Fungos primariamente patogênicos são capazes de infectar mesmo indivíduos com o sistema imunológico íntegro, utilizando mecanismos próprios de invasão e evasão do sistema imune. Já os fungos oportunistas afetam principalmente pessoas imunocomprometidas, aproveitando-se de estados clínicos fragilizados para se estabelecer como agentes infecciosos. O aumento desses casos nos hospitais e clínicas mostra a importância de entender melhor como esses fungos agem, como se espalham e os desafios que trazem para o diagnóstico e o tratamento médico.

1.2. Infecção Fúngica: Desafio Clínico

As infecções fúngicas vêm ganhando cada vez mais atenção no cenário da saúde global e já são consideradas uma das maiores ameaças do século XXI, especialmente para pessoas com o sistema imunológico fragilizado. Em um corpo saudável, o sistema imunológico costuma dar conta de eliminar os fungos com os quais entramos em contato diariamente. Mas esse equilíbrio pode se romper quando há uma queda na imunidade, seja por alguma doença, condição médica ou tratamento. Nesses casos, os fungos podem se tornar perigosos e levar a infecções graves, que hoje são responsáveis por cerca de 1,7 milhão de mortes por ano, um número maior que o da malária e próximo ao da tuberculose²⁵⁻²⁷.

Entre os fungos mais preocupantes estão *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* (causador de cerca de 600 mil mortes anuais), *Cryptococcus neoformans* (com cerca de 200 mil mortes por ano) e a emergente *Candida auris*, considerada pela OMS um patógeno crítico por apresentar resistência a diversos medicamentos antifúngicos em mais de 40% dos casos²⁸⁻³⁰.

Essas infecções podem ser divididas em dois grandes grupos:

- As chamadas infecções fúngicas primárias, que podem atingir até pessoas com o sistema imunológico normal.
- E as infecções oportunistas, que afetam principalmente pacientes imunocomprometidos, como aqueles em tratamento para câncer ou vivendo com HIV.

As manifestações também variam bastante — desde quadros mais leves, como a candidíase oral ou vaginal, até infecções invasivas, que acometem órgãos como pulmões, fígado e até o cérebro. Nessas formas mais graves, a evolução pode ser rápida e fatal.

Nos últimos anos, o número de casos só cresceu. Tratamentos imunossupressores, transplantes e doenças crônicas estão entre os fatores que contribuem para esse aumento. Grupos especialmente vulneráveis incluem pacientes com câncer em quimioterapia, pessoas transplantadas, usuários frequentes de corticoides, além de indivíduos com HIV, diabetes ou tuberculose. Pacientes internados em UTIs, principalmente os que passaram por cirurgias ou receberam antibióticos por muito tempo, também correm mais riscos^{25,27,31}.

Durante a pandemia de COVID-19, a situação se agravou. A combinação de imunossupressão causada pelo uso de corticoides, os danos aos pulmões provocados pelo vírus e o ambiente hospitalar favoreceu o surgimento de coinfeções fúngicas sérias. Um exemplo marcante foi o aumento alarmante dos casos de mucormicose, conhecida como "fungo negro", na Índia, que chegou a crescer entre 300% e 500% entre 2021 e 2022^{25,27,31-34}.

Em pacientes transplantados, as infecções fúngicas estão entre as principais complicações no período pós-operatório. Isso porque, para evitar rejeições, esses pacientes recebem altas doses de imunossupressores, o que os torna alvos fáceis para fungos como *Aspergillus spp.* e *Candida spp.*. Em alguns casos, essas infecções podem aparecer logo nos primeiros dias após o transplante, cerca de 30% dos receptores de pulmão, por exemplo, desenvolvem aspergilose invasiva^{25,35}. O risco também aumenta durante episódios de rejeição, quando a imunossupressão precisa ser intensificada. Se o diagnóstico for tardio ou a profilaxia falhar, as consequências podem ser sérias: desde a perda do órgão transplantado até o óbito^{35,36}.

Além disso, a presença de infecções fúngicas tanto no doador quanto no receptor pode representar um obstáculo ao transplante. No receptor, uma

infecção existente pode se espalhar com a imunidade baixa; no doador, há o risco de transmissão do fungo junto com o órgão. Apesar de situações assim serem raras, elas exigem protocolos rígidos de triagem e tratamento antifúngico adequado^{25,35,36}

A TABELA 1.2 resume os dados mais relevantes, mostrando a incidência dessas infecções nos principais grupos de risco e suas taxas de mortalidade.

TABELA 1.2 - Incidência, principais agentes e taxas de mortalidade associadas às infecções fúngicas(IFs) em diferentes grupos de risco.

Grupo	Incidência de IFs	Principais patógenos	Mortalidade
Transplantados	20-30%	Aspergillus, Candida	40-60%
Pacientes com câncer	15-20%	Candida, Mucorales	30-50%
UTI/COVID-19	10-15%	Candida, Aspergillus	20-40%
HIV avançado	5-10%	Cryptococcus, Histoplasma	25-35%

Fonte: O Autor

As infecções fúngicas (IFs) representam sério desafio para a saúde pública mundial. Estima-se que mais de 300 milhões de pessoas sejam afetadas todos os anos, resultando em cerca de 1,5 milhão de mortes^{25,27}. Diante desse cenário, a Organização Mundial da Saúde (OMS) passou a reconhecer essas infecções como uma das principais causas de mortalidade entre grupos mais vulneráveis, como pessoas imunocomprometidas. A OMS também reforça a importância de estratégias bem coordenadas que envolvam o diagnóstico precoce, o acesso adequado a medicamentos antifúngicos e a ampliação da vigilância epidemiológica para lidar com esse problema de forma mais eficaz ^{25,26}.

1.3. Sintomas e Complicações

As infecções fúngicas invasivas (IFIs) ainda são um grande desafio quando falamos em diagnóstico, principalmente porque, na maioria das vezes, os sintomas iniciais são bastante genéricos. Febre que não passa mesmo com antibióticos, cansaço extremo e perda de peso progressiva são sinais comuns que também aparecem em doenças como tuberculose, pneumonias bacterianas ou até alguns tipos de câncer. Essa semelhança acaba dificultando a detecção precoce e, em média, o diagnóstico pode demorar de duas a quatro semanas para ser feito

corretamente, um atraso que pode custar vidas³⁷⁻³⁹, já que a mortalidade pode variar entre 40% e 60%, dependendo do fungo envolvido.

Nesse tempo de incerteza, muitos pacientes acabam sendo tratados para doenças mais frequentes antes que se confirme a real causa dos sintomas. Um exemplo marcante vem de um estudo brasileiro, que revelou que 62% dos casos de histoplasmose pulmonar foram inicialmente tratados como tuberculose, e a medicação antifúngica adequada só começou, em média, após mais de três meses⁴⁰⁻⁴³. O mesmo ocorre com a aspergilose: em muitos casos, os pacientes chegam a passar por procedimentos invasivos, como biópsias pulmonares, antes de se obter uma confirmação do diagnóstico⁴⁴⁻⁴⁶.

Com o avanço da infecção, os sintomas ficam mais específicos e também mais graves. Na forma pulmonar, por exemplo, uma tosse seca pode evoluir para hemoptise (sangue no escarro) em cerca de 30% dos casos de aspergilose invasiva⁴⁷. Já na pneumocistose, há uma piora respiratória acelerada, com queda nos níveis de oxigênio mesmo com suporte⁴⁸. Quando o sistema nervoso é afetado, o quadro também assusta: a meningite por *Cryptococcus* começa com dor de cabeça e alterações cognitivas sutis, mas pode evoluir para coma em questão de semanas^{49,50}. E em casos de mucormicose rinocerebral, que costuma atingir pacientes diabéticos, o avanço é tão rápido que pode causar necrose e trombose em apenas 72 horas^{44,51}.

As formas mais graves as infecções disseminadas são particularmente alarmantes. A candidíase invasiva, por exemplo, pode causar lesões na pele^{52,53}, falência de múltiplos órgãos⁵⁴ e até choque séptico⁵⁵. Uma análise de autópsias mostrou que 40% dos abscessos no fígado e no baço em pacientes com baixa imunidade tinham origem fúngica, mas não foram diagnosticados enquanto os pacientes estavam vivos^{44,56,57}.

O cenário se torna ainda mais crítico com a emergência de fungos resistentes, como a *Candida auris*, que desafia os tratamentos convencionais e tem causado surtos em UTIs com mortalidade acima de 60%. Muitos desses casos só são descobertos após o falecimento do paciente²⁸⁻³⁰. Em pessoas com diabetes mal controlado, o risco também aumenta bastante: quando a glicemia está desregulada (HbA1c acima de 9%), a mortalidade por mucormicose pode triplicar^{32,58}. E cada dia perdido no diagnóstico e início do tratamento pode aumentar quase duas vezes o risco de morte⁵⁹.

Mesmo quando o tratamento é bem-sucedido, as sequelas deixadas por essas infecções podem comprometer profundamente a qualidade de vida dos sobreviventes. Quem passa por um episódio de aspergilose pulmonar, por exemplo, pode desenvolver fibrose residual nos pulmões, com falta de ar e limitação física prolongada, o que muitas vezes exige reabilitação ou até suporte respiratório contínuo^{38,60}. No caso da meningite criptocócica, é comum que persistam alterações cognitivas, de memória e até de coordenação motora, especialmente quando houve aumento da pressão intracraniana ou evolução prolongada da infecção^{51,61}. Já os pacientes que enfrentaram mucormicose rinocerebral, particularmente os diabéticos, muitas vezes ficam com sequelas faciais graves, como perda dos olhos, destruição do palato ou ossos da face, além de paralisias. Esses impactos vão muito além do físico: afetam a autoestima, a reintegração social e a saúde mental⁵⁸. Diante de tudo isso, fica claro que o cuidado não termina com a alta hospitalar. É fundamental oferecer acompanhamento multiprofissional, com pneumologistas, neurologistas, psicólogos e fisioterapeutas, para garantir uma recuperação mais completa e digna para quem sobrevive às IFIs^{38,62}.

1.4. Diagnóstico de Infecções fúngicas, Métodos Tradicionais e Limitações

O diagnóstico das infecções fúngicas invasivas (IFIs) ainda representa um dos grandes desafios da prática clínica. Como essas infecções envolvem diferentes agentes e podem se manifestar em diferentes órgãos e sistemas, o que torna difícil confiar em um único exame para obter uma resposta definitiva. Por isso, é fundamental adotar uma abordagem multiparamétrica, que combine métodos laboratoriais, exames de imagem, análise clínica e, quando necessário, procedimentos invasivos e, principalmente, a história clínica detalhada do paciente, incluindo sinais, sintomas, comorbidades e fatores de risco. Essa combinação amplia significativamente as chances de um diagnóstico preciso e oportuno, permitindo a escolha de uma conduta terapêutica mais assertiva e potencialmente salvadora^{38,39,62}.

A microscopia óptica é, muitas vezes, o primeiro passo na investigação. Com o uso de colorações como Grocott-Gomori e PAS, como representado da FIGURA 1.3, esse exame permite visualizar estruturas fúngicas como hifas, leveduras e esporos. Trata-se de uma técnica acessível, rápida e de

baixo custo, mas com sensibilidade variável (entre 30% e 70%). Além disso, ela não diferencia colonização de infecção ativa, sendo altamente dependente da qualidade da amostra e da experiência de quem realiza a leitura^{44,63,64}.

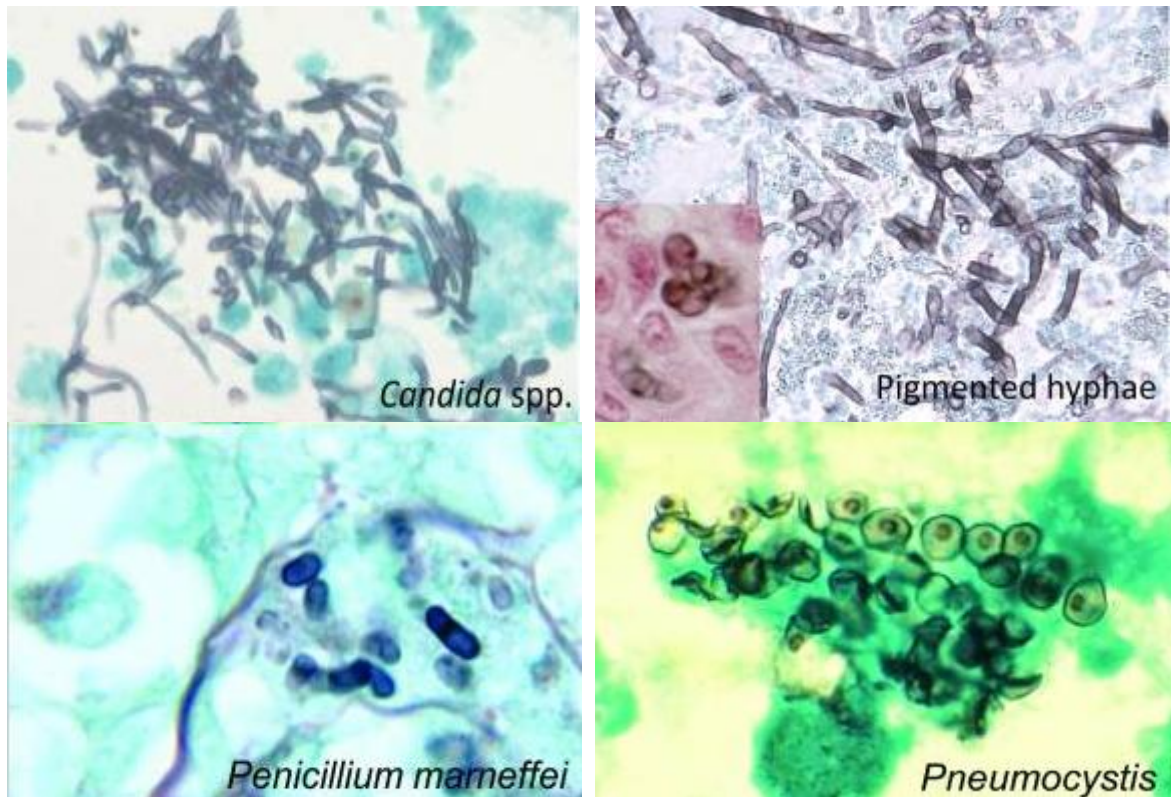


FIGURA 1.3 - Imagens histológicas evidenciando a morfologia típica de leveduras em tecidos infectados, corados com Grocott-Gomori (GMS) nas espécies A, B e C, e Fontana-Masson na espécie D.

Fonte: Adaptado de Guarner J. e Brandt⁶³.

O cultivo permanece como padrão-ouro para a confirmação etiológica, pois permite identificar a espécie do fungo e realizar testes de sensibilidade a antifúngicos. No entanto, essa abordagem também tem suas limitações. Algumas espécies, especialmente as dimórficas, podem levar semanas para crescer, e o resultado pode ser comprometido quando a amostra tem baixa carga fúngica ou está contaminada com bactérias ou fungos ambientais^{39,44,62}.

Exames de imagem, como tomografia computadorizada e ressonância magnética, também são aliados importantes. Embora não sejam específicos para IFIs, eles ajudam a localizar lesões sugestivas (como nódulos com sinal do halo invertido, cavitações, abscessos cerebrais) e guiam a indicação de procedimentos diagnósticos como biópsias e drenagens^{39,46,65,66}.

Em situações em que há suspeita de acometimento profundo, como lesões pulmonares ou abscessos cerebrais, a biópsia de tecido infectado pode ser essencial. Esse tipo de procedimento fornece material para análise histopatológica,

cultivo e testes moleculares (como PCR ou NGS), oferecendo um panorama mais completo da infecção. Porém, por se tratar de um procedimento invasivo, há riscos cirúrgicos envolvidos, além de dificuldades logísticas relacionadas ao acesso anatômico e à preservação adequada do material coletado^{39,44,62}.

Exames imunológicos como o ELISA para detecção de (1→3)- β -D-glucano e galactomanana têm ganhado espaço nos últimos anos. Eles oferecem resultados rápidos e boa sensibilidade para espécies como *Aspergillus spp.* e *Candida spp.*, sendo úteis para triagem e monitoramento. No entanto, interferências laboratoriais, como o uso de hemoderivados, antibióticos β -lactâmicos e imunoglobulinas, podem levar a resultados falso-positivos. Além disso, esses testes ainda não contemplam muitos fungos emergentes ou de distribuição regional, o que exige que laboratórios desenvolvam seus próprios protocolos, com desempenho muitas vezes instável^{45,67,68}.

As técnicas moleculares, como a PCR em tempo real e o sequenciamento de nova geração (NGS), trouxeram avanços importantes ao permitir a detecção de DNA fúngico diretamente de amostras clínicas como em sangue, soro, lavado broncoalveolar e tecidos. Essas abordagens ampliaram significativamente a sensibilidade diagnóstica, especialmente em casos em que o cultivo falha. No entanto, a simples presença de DNA fúngico não confirma infecção ativa, e a falta de padronização entre laboratórios, desde a extração do material genético até a análise dos dados, compromete a reprodutibilidade dos resultados. Além disso, mutações nas regiões-alvo dos primers, a degradação do DNA em amostras fixadas em formol e a complexidade das infecções mistas também dificultam a interpretação dos achados^{39,45,46,68}.

A espectrometria de massas por MALDI-TOF MS é outra ferramenta promissora, principalmente pela rapidez com que identifica colônias de leveduras — muitas vezes em questão de minutos. Para *Candida spp.* e outras leveduras, a acurácia é bastante elevada. Entretanto, a técnica ainda enfrenta limitações na identificação de fungos filamentosos, além de exigir um investimento inicial considerável em equipamentos e infraestrutura, o que restringe seu uso a centros mais especializados^{69,70}.

Por fim, nenhum resultado laboratorial, por mais avançado que seja, deve ser interpretado isoladamente. A construção do diagnóstico em IFIs depende da integração de todos esses elementos com a história clínica completa do paciente:

presença de neutropenia, uso recente de corticoides ou agentes biológicos, transplantes, HIV, exposição ocupacional e viagens a regiões endêmicas são apenas alguns exemplos de informações que fazem toda a diferença. Quando essa correlação é bem-feita, estudos mostram que a acurácia diagnóstica pode aumentar em até 30%, reduzindo o tempo para início da terapia antifúngica adequada um fator decisivo para melhorar o prognóstico e reduzir complicações nos pacientes que enfrentam essas infecções desafiadoras^{38,39,62}.

1.5. Fundamentos e Aplicações dos Imunoensaios e Imunossensores

1.5.1. Imunoensaios

Os imunoensaios são métodos analíticos que se baseiam na interação altamente específica entre anticorpos e antígenos. Essa interação confere a essas técnicas uma combinação única de seletividade e sensibilidade, tornando-as indispensáveis em diversas áreas, como o diagnóstico clínico^{71,72}, monitoramento ambiental^{73,74}, segurança alimentar^{75,76} e controle de qualidade farmacêutico^{77,78}. A chave para essa especificidade está na capacidade dos anticorpos de reconhecer e se ligar com alta afinidade a regiões específicas dos antígenos, chamadas epítomos⁷⁷.

Os anticorpos, também conhecidos como imunoglobulinas (Ig), são glicoproteínas produzidas pelos linfócitos B como resposta à presença de agentes potencialmente perigosos, denominados antígenos. Praticamente qualquer substância capaz de ativar o sistema imune pode ser considerada um antígeno, desde toxinas e alérgenos até microrganismos como vírus, bactérias, protozoários e fungos⁷⁹⁻⁸¹.

Estruturalmente, os anticorpos são compostos por duas cadeias leves (~23 kDa) e duas cadeias pesadas (~50 kDa), unidas por pontes dissulfeto (FIGURA 1.4). Essas moléculas apresentam duas regiões funcionais principais: a região Fab, responsável pela ligação ao antígeno, e a região Fc, que define a classe e a função biológica da imunoglobulina^{79,80,82}. Nos mamíferos, existem cinco classes principais: IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, cada uma com função imunológica específica e janela de detecção própria^{83,84}. A IgG é a mais abundante no soro humano, sendo amplamente empregada em imunoensaios devido à sua estabilidade e longa meia-vida (~23 dias).

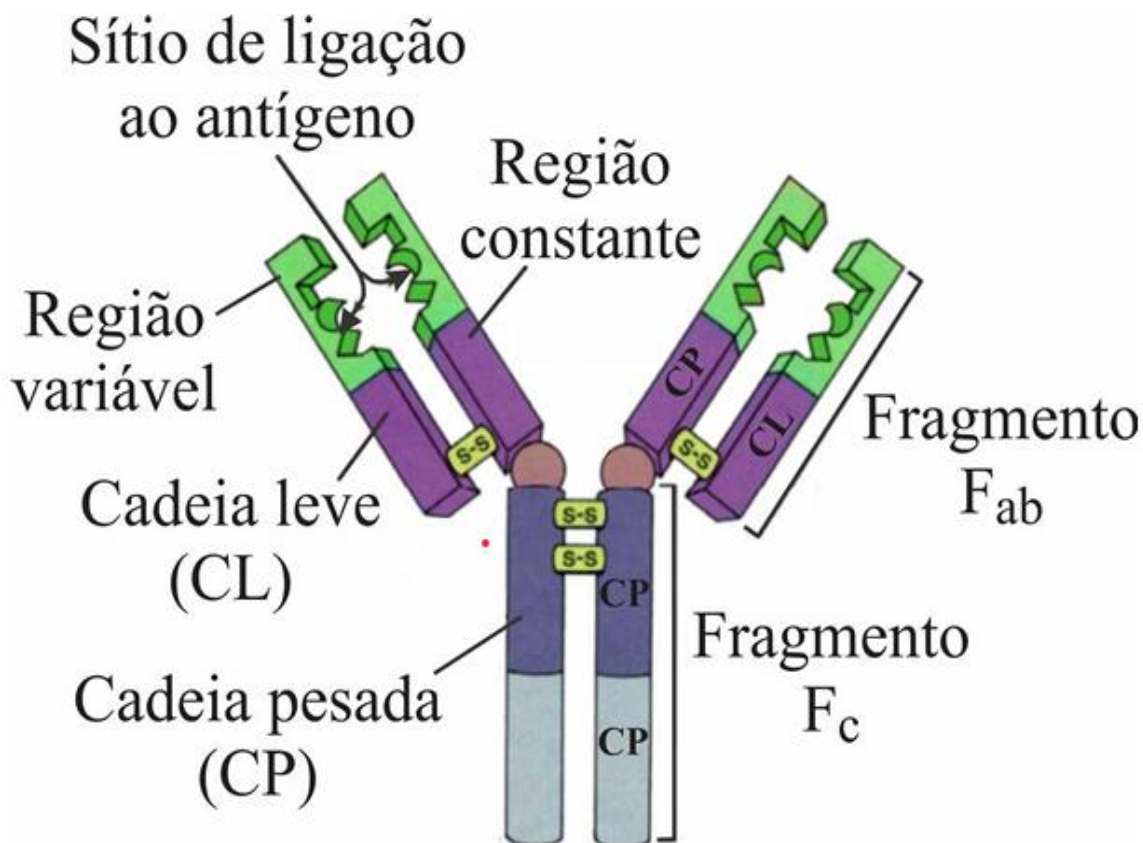


FIGURA 1.4 - Estrutura de um anticorpo composto por cadeias leves e pesadas e fragmentos.

Fonte: Adaptado de Moser, M; Leo, O⁸⁵.

A ligação entre antígeno (Ag) e anticorpo (Ab) ocorre por forças não covalentes, como interações eletrostáticas, hidrofóbicas e ligações de hidrogênio^{78,86}, resultando na formação de um imunocomplexo (AgAb) altamente específico. Esse complexo é descrito por meio da constante de afinidade (K_a), que relaciona as concentrações de imunocomplexo, antígeno livre e sítios livres de anticorpos em equilíbrio (EQUAÇÃO 1.1)⁸⁷.

$$\text{Ag} + \text{Ab} \rightleftharpoons \text{AgAb} \quad K = \frac{[\text{AgAb}]}{[\text{Ag}][\text{Ab}]} \quad \text{EQUAÇÃO 1.1}$$

Os imunoenaios podem ser classificados com base em dois critérios principais:

- I. **Arquitetura do ensaio** – competitivo ou não competitivo;
- II. **Modo de detecção** – direto ou indireto.

Essas abordagens não são excludentes e frequentemente coexistem em sistemas analíticos híbridos.

Detecção Direta: Neste modelo, o anticorpo primário é diretamente conjugado a um marcador, como enzimas, fluoróforos ou nanopartículas. É um

formato mais simples e rápido, que requer menos etapas: a amostra é incubada com o anticorpo marcado e, após lavagem, o sinal é detectado. As vantagens incluem rapidez e a eliminação de interferências por anticorpos secundários. No entanto, a marcação direta pode reduzir a afinidade do anticorpo e, por usar apenas um marcador por antígeno, o método apresenta menor sensibilidade quando comparado à detecção indireta, FIGURA 1.5 ⁷⁸.

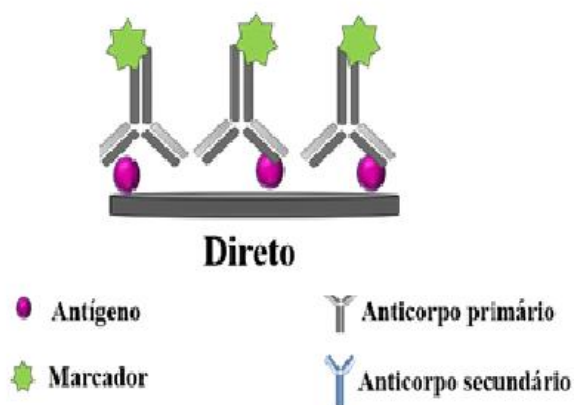


FIGURA 1.5 - Esquema do imunoenensaio do tipo Direto.

Fonte: Oliveira⁸⁸

Detecção Indireta: Neste formato, um anticorpo secundário marcado reconhece e se liga ao anticorpo primário previamente ligado ao antígeno (FIGURA 1.6). Esse modelo permite a amplificação do sinal, pois vários anticorpos secundários podem se ligar a um mesmo anticorpo primário. Embora mais sensível e versátil, a técnica pode gerar sinais inespecíficos devido à reatividade cruzada do anticorpo secundário, além de exigir uma etapa adicional de incubação, aumentando o tempo de análise.

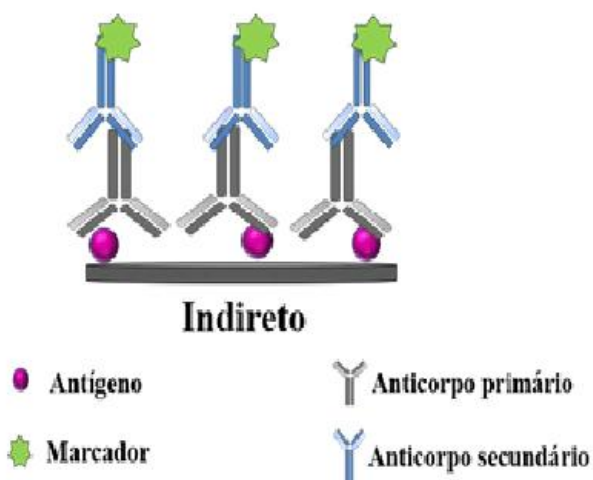


FIGURA 1.6 - Esquema do imunoenensaio do tipo Indireto.

Fonte: Oliveira⁸⁸

Imunoensaio Competitivo: Neste tipo de ensaio, o analito da amostra compete com um analito marcado (ou com um antígeno imobilizado) pelos sítios de ligação do anticorpo, FIGURA 1.7, após a incubação, o excesso é removido e o sinal é medido: quanto mais analito estiver presente na amostra, menos anticorpos estarão disponíveis para se ligar à versão marcada, o que gera um sinal inversamente proporcional à concentração do analito. Essa abordagem é ideal para moléculas pequenas, como hormônios, pesticidas e fármacos, que não possibilitam ligação simultânea a dois anticorpos⁸⁹. Apesar de sua utilidade, esse formato possui menor sensibilidade que os métodos não competitivos e é mais suscetível a interferências da matriz⁹⁰.

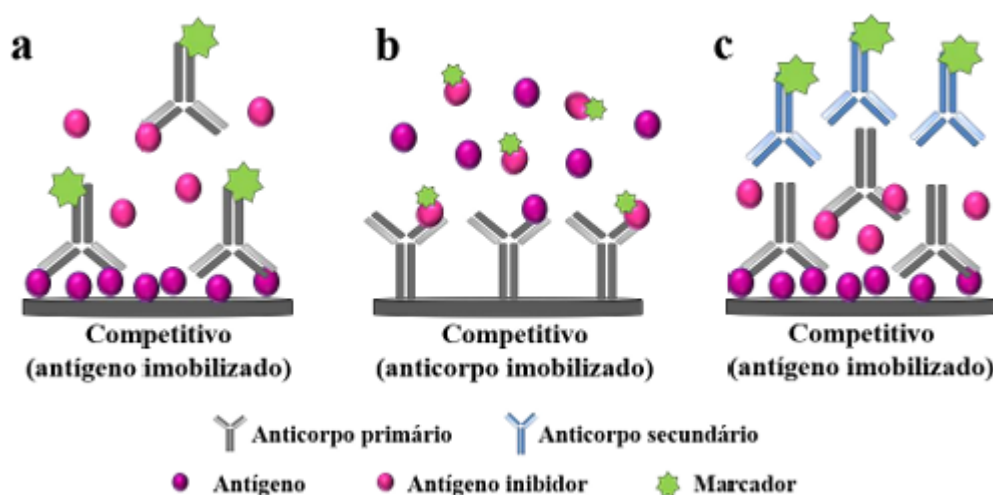


FIGURA 1.7 - Esquema do imunoensaio competitivo direto com a) antígenos imobilizados e anticorpo marcado e b) anticorpo imobilizado e o antígeno marcado. c) Esquema do imunoensaio competitivo indireto com antígenos imobilizados e anticorpo secundário marcado.

Fonte: Oliveira⁸⁸

Imunoensaio Não Competitivo (Sanduíche): Os imunoensaios não competitivos, conhecidos também como formato sanduíche, são amplamente utilizados em diagnósticos clínicos devido à sua alta sensibilidade e especificidade. Esse tipo de ensaio é ideal para detecção de antígenos maiores ou que apresentam múltiplos epítomos. O ensaio tipo "sanduíche" envolve dois anticorpos: o primeiro, imobilizado (anticorpo de captura), captura o antígeno da amostra, e o segundo, marcado (anticorpo de detecção), reconhece outro epítopo do mesmo antígeno (FIGURA 1.8), formando assim um verdadeiro "sanduíche" entre os dois anticorpos e o antígeno. O sinal gerado é diretamente proporcional à concentração do antígeno⁹¹.

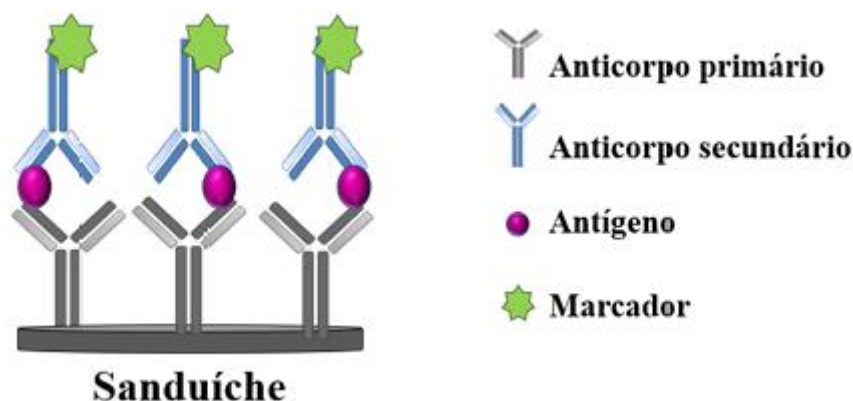


FIGURA 1.8 - Esquema do imunossensaio do tipo sanduíche.

Fonte: Oliveira⁸⁸

Diversos marcadores podem ser empregados em imunossensaios incluindo enzimas (peroxidase e fosfatase alcalina), nanopartículas metálicas (AuNPs, AgNPs), fluoróforos, radioisótopos e, mais recentemente, materiais nanoestruturados com propriedades condutivas ou plasmônicas^{92,93}.

1.5.2. Imunossensores

Os imunossensores representam um avanço notável em relação aos imunossensaios convencionais, ao unirem um elemento de reconhecimento biológico, como anticorpos ou antígenos, a um transdutor físico-químico capaz de converter o evento de ligação molecular em um sinal detectável. Essa integração tecnológica tem possibilitado o desenvolvimento de dispositivos portáteis, rápidos e altamente sensíveis, com tempos de resposta inferiores a 15 minutos e limites de detecção na faixa de femtogramas por mililitro (fg/mL), tornando-os ideais para aplicações em ambientes point-of-care (POC), especialmente em locais com infraestrutura limitada⁹⁴⁻⁹⁶.

Conforme o tipo de transdução empregada, os imunossensores podem ser classificados em diferentes categorias:

Eletroquímicos: utilizam princípios como amperometria, voltametria ou impedância eletroquímica^{94,95,97};

Ópticos: baseiam-se em fenômenos como ressonância de plasmons de superfície (SPR) ou fluorescência^{95,96,98};

Piezoelétricos: medem variações de massa por meio de dispositivos como a balança de cristal de quartzo^{94,96,97};

Térmicos: detectam alterações de calor geradas nas reações imunológicas^{94,96,97}.

O desempenho desses dispositivos depende de uma série de fatores, incluindo sensibilidade (LOD), tempo de resposta, estabilidade ao longo do tempo e capacidade de reutilização⁹⁴⁻⁹⁶. Avanços recentes em áreas como imobilização de biocomponentes, uso de nanomateriais condutores (ex.: nanopartículas de ouro, óxidos metálicos e grafeno funcionalizado) e integração com sistemas microfluídicos têm contribuído para a criação de sensores mais robustos e miniaturizados. Esses dispositivos são capazes de realizar análises ultra-sensíveis em poucos minutos, mesmo em volumes reduzidos de amostra^{94,95,97}.

Na prática, os imunossensores já demonstram grande aplicabilidade em diferentes contextos: desde a detecção de biomarcadores clínicos, como a troponina cardíaca em plataformas descartáveis, até a identificação de micotoxinas em alimentos, hormônios ambientais e resíduos de fármacos em águas residuais. A tendência atual aponta para o desenvolvimento de sistemas integrados no formato lab-on-a-chip, com interfaces conectadas a smartphones, leitura automatizada e suporte a análises em nuvem, recursos que aproximam a tecnologia do cotidiano e da realidade clínica⁹⁴⁻⁹⁷.

Em resumo, enquanto os imunoensaios tradicionais permanecem como ferramentas indispensáveis nos laboratórios clínicos e de pesquisa, os imunossensores surgem como uma alternativa inovadora, aliando portabilidade, rapidez e sensibilidade. Essa evolução tecnológica está em sintonia com as demandas contemporâneas por soluções mais acessíveis, eficazes e descentralizadas, com impacto direto nas áreas de saúde pública, segurança alimentar e monitoramento ambiental.

1.5.3. Imunoensaios no Diagnóstico de Infecções Fúngicas Invasivas

Os imunoensaios vêm se consolidando como ferramentas centrais no diagnóstico de infecções fúngicas invasivas (IFIs), graças à sua capacidade de unir alta sensibilidade analítica com especificidade molecular — características essenciais para a detecção precoce dessas infecções, que frequentemente apresentam evolução silenciosa e de difícil rastreamento clínico^{67,99}. Fundamentados na interação precisa entre anticorpos e antígenos, esses métodos aproveitam a habilidade natural do sistema imunológico em reconhecer estruturas moleculares específicas dos patógenos fúngicos, convertendo essa resposta biológica em sinais detectáveis e quantificáveis^{100,101}.

No contexto das IFIs, dois tipos de anticorpos têm destaque: IgM e IgG. As IgM geralmente surgem nos primeiros dias da infecção (3 a 5 dias), funcionando como marcadores da fase aguda. Já as IgG aparecem mais tardiamente (entre 14 e 21 dias), mas permanecem por períodos prolongados no organismo, sendo indicativas de exposição passada ao agente infeccioso (Kaufman et al., 2023). Compreender essa dinâmica temporal da resposta imune é fundamental para a correta interpretação dos resultados — especialmente em pacientes imunocomprometidos, cuja produção de anticorpos pode ser reduzida ou retardada^{100,101}.

Entre os diferentes formatos de imunoensaio, os do tipo sanduíche têm se mostrado altamente eficazes para detectar antígenos com múltiplos epítomos, como a galactomanana de *Aspergillus*, com limites de detecção na ordem de 0,5 a 1,0 ng/mL (CLSI, 2023)⁶⁷. Nessa abordagem, dois anticorpos monoclonais distintos — um para captura e outro para detecção — reconhecem diferentes regiões da mesma molécula, conferindo alta especificidade e robustez analítica. Por outro lado, os ensaios competitivos são preferidos quando se deseja detectar moléculas menores, como metabólitos fúngicos, pois apresentam menor suscetibilidade a interferências em matrizes complexas, como sangue total ou amostras de lavado broncoalveolar⁶⁷.

O avanço dos imunossensores, sobretudo os de base eletroquímica, tem ampliado ainda mais as possibilidades de diagnóstico rápido e portátil. Dispositivos que utilizam grafeno funcionalizado, por exemplo, já atingem limites de detecção extremamente baixos, próximos a 0,1 pg/mL⁶⁷. Além disso, plataformas

microfluídicas vêm permitindo a detecção multiplexada, ou seja, a identificação simultânea de diferentes espécies fúngicas em um único sistema analítico. Tais inovações superam limitações dos métodos convencionais, principalmente no que diz respeito à rapidez da análise, miniaturização e aplicabilidade em campo.

Ainda assim, é essencial considerar os fatores que podem interferir na interpretação dos resultados. Resultados falso-positivos podem surgir pela presença de substâncias como albumina em altas concentrações (>5%), uso de membranas de diálise com celulose, ou ainda por reações cruzadas com antígenos de fungos ambientais. Já os falso-negativos são frequentemente associados a terapia antifúngica prévia, baixa carga fúngica (<50 CFU/mL) ou imunossupressão grave, que pode comprometer a produção de anticorpos¹⁰¹.

Dessa forma, a integração entre os dados sorológicos, o quadro clínico e exames complementares é crucial para elevar a confiabilidade do diagnóstico. Estudos recentes mostram uma concordância de 78 a 92% entre imunoenaios e métodos culturais em casos confirmados de IFIs⁶⁷.

1.6. Tecnologias Emergentes em Imunoensaios

1.6.1. Dispositivos Eletroquímicos (SEDs)

A eletroquímica, quando aplicada à análise de espécies químicas, baseia-se na resposta gerada na interface entre o eletrodo e a solução eletrolítica — onde ocorrem fenômenos associados à transferência de carga e às propriedades dielétricas do sistema. Essa interação é explorada de forma estratégica no desenvolvimento de sensores e biossensores, com destaque para dispositivos já consagrados, como o sensor amperométrico de glicose. Introduzido comercialmente na década de 1960, esse sensor continua amplamente utilizado até os dias de hoje. Seu funcionamento é baseado na enzima glicose oxidase, que catalisa a oxidação da glicose, gerando peróxido de hidrogênio — um composto eletroativo que pode ser detectado eletricamente⁹⁶. Trata-se de um exemplo clássico que ilustra bem como produtos de reações enzimáticas podem ser monitorados por meio de sinais eletroquímicos.

Em comparação com métodos tradicionais de análise laboratorial, os sensores eletroquímicos oferecem uma série de vantagens práticas. São dispositivos de baixo custo, de fácil operação, que fornecem respostas rápidas e, na maioria das vezes, dispensam etapas complexas de preparo de amostra. Além

disso, apresentam alta sensibilidade — uma característica essencial em aplicações que exigem a detecção de compostos em baixíssimas concentrações, especialmente em matrizes complexas¹⁰². Somam-se a esses benefícios a possibilidade de miniaturização dos sensores, o que os torna perfeitamente compatíveis com plataformas portáteis, voltadas para diagnósticos em tempo real.

A construção desses sensores é bastante versátil, podendo envolver diferentes materiais condutores. Entre os mais utilizados estão o carbono vítreo e o ouro, escolhidos por suas amplas janelas de potencial, resistência mecânica e facilidade de modificação superficial. Essas propriedades são particularmente úteis quando se busca adaptar o sensor a diferentes contextos analíticos.

Nos últimos anos, especialmente no campo do diagnóstico clínico, os eletrodos descartáveis vêm ganhando protagonismo. Isso porque, além de dispensarem processos como polimento e regeneração da superfície, também reduzem custos, tempo de análise e o risco de contaminação cruzada — um aspecto crítico em ambientes clínicos e laboratoriais.

Nesse cenário, os sensores eletroquímicos descartáveis (SEDs) se destacam como uma alternativa cada vez mais promissora. Eles podem ser produzidos por diferentes técnicas, como sputtering, impressão a jato de tinta e, especialmente, serigrafia. Os chamados eletrodos serigrafados (screen-printed electrodes – SPEs) têm se consolidado como uma das plataformas mais acessíveis e eficazes, sendo inclusive encontrados comercialmente em larga escala¹⁰³.

Esses sensores consistem, basicamente, em eletrodos impressos sobre substratos isolantes, como poliéster, cerâmica, papel ou PVC, utilizando tintas condutoras à base de carbono, ouro ou prata/cloreto de prata. A técnica de serigrafia permite depositar essas tintas de forma precisa, utilizando máscaras ou estênceis com o formato desejado, seguidos por uma etapa de cura térmica¹⁰⁴. O processo é simples, eficiente e compatível com a produção em larga escala, com boa reprodutibilidade e baixo custo. Além disso, permite uma enorme flexibilidade no design dos sensores, o que facilita adaptações para diferentes finalidades — como análises clínicas, ambientais ou alimentares¹⁰⁵. A FIGURA 1.9 ilustra alguns exemplos de geometrias e layouts desses dispositivos produzidos por serigrafia.

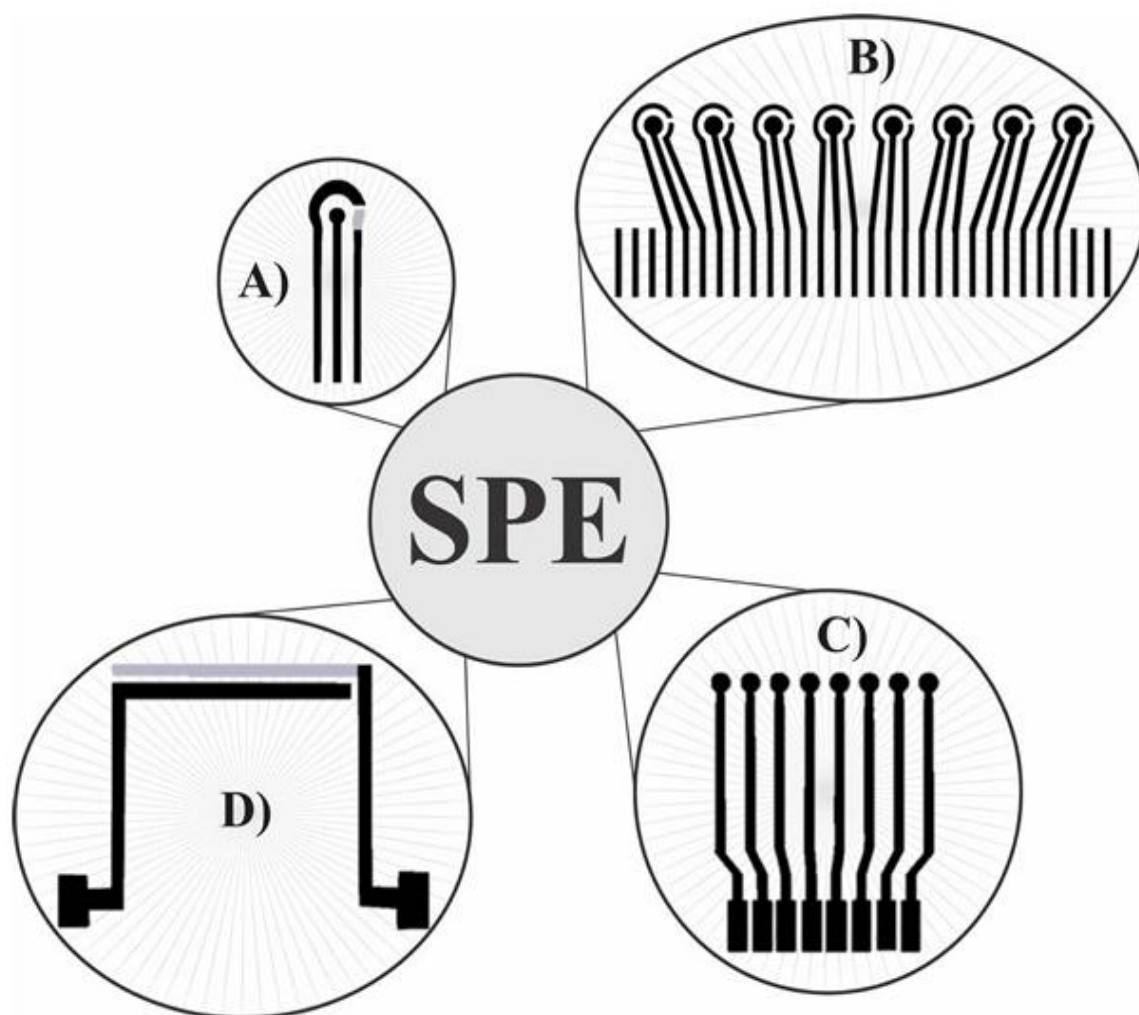


FIGURA 1.9- SPEs em diferentes formatos e em arranjos de oito eletrodos para aplicações simultâneas. Sendo: (A) Célula unitária completa, (B) arranjo de oito células eletroquímicas completas, (C) arranjo contendo oito eletrodos de trabalho e (D) arranjo contendo os eletrodos de referência e contra eletrodo.

Fonte: Silva¹⁰⁶.

Entre os principais atrativos dos SEDs estão o baixo custo de produção, o reduzido consumo de reagentes, a portabilidade e a simplicidade de operação¹⁰⁵. Essas características os tornam ideais para aplicações em point-of-care testing (POCT) — situações em que diagnósticos rápidos, acessíveis e confiáveis são indispensáveis. O fato de serem descartáveis ainda contribui para a segurança do processo, evitando contaminações e facilitando o controle de qualidade em ambientes críticos.

Por fim, vale destacar que os SEDs não se limitam à detecção eletroquímica convencional. Esses dispositivos podem ser funcionalizados com uma ampla variedade de nanomateriais, como nanopartículas metálicas (AuNPs, AgNPs), nanomateriais carbonáceos (grafeno, óxido de grafeno, nanotubos de carbono), polímeros condutores ou partículas magnéticas. Essas modificações

ampliam a área eletroativa, favorecem a transferência de carga e facilitam a imobilização de biomoléculas específicas — como enzimas, anticorpos ou sondas genéticas. Com isso, os SEDs se transformam em plataformas altamente personalizáveis, capazes de atender às mais diversas demandas analíticas com precisão e eficiência^{103–105,107,108}.

1.7. Nanomateriais: Partículas Magnéticas e Nanopartículas de Ouro

O uso de nanomateriais em imunossensores eletroquímicos tem transformado o desempenho desses dispositivos, especialmente no que diz respeito à sensibilidade e à seletividade. Graças a essas tecnologias, tornou-se possível realizar análises em matrizes complexas — como soro, saliva e escarro — alcançando limites de detecção extremamente baixos, adequados a contextos clínicos desafiadores^{109,110}. Entre os nanomateriais mais explorados destacam-se as partículas magnéticas de óxidos de ferro e as nanopartículas de ouro (AuNPs), que atuam de maneira complementar tanto na captura do analito quanto na amplificação do sinal eletroquímico.

As partículas magnéticas (PMs), geralmente compostas por magnetita (Fe_3O_4) ou maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), exibem uma propriedade chamada superparamagnetismo. Isso significa que podem ser manipuladas por campos magnéticos sem reter magnetização residual, o que evita a agregação irreversível entre elas. Comercialmente disponíveis em tamanhos nano- ou micrométricos, essas partículas costumam apresentar grupos terminais como $-\text{NH}_2$, $-\text{COOH}$ ou $-\text{OH}$, que facilitam sua funcionalização com biomoléculas — incluindo anticorpos, aptâmeros, enzimas ou sondas genéticas¹¹¹.

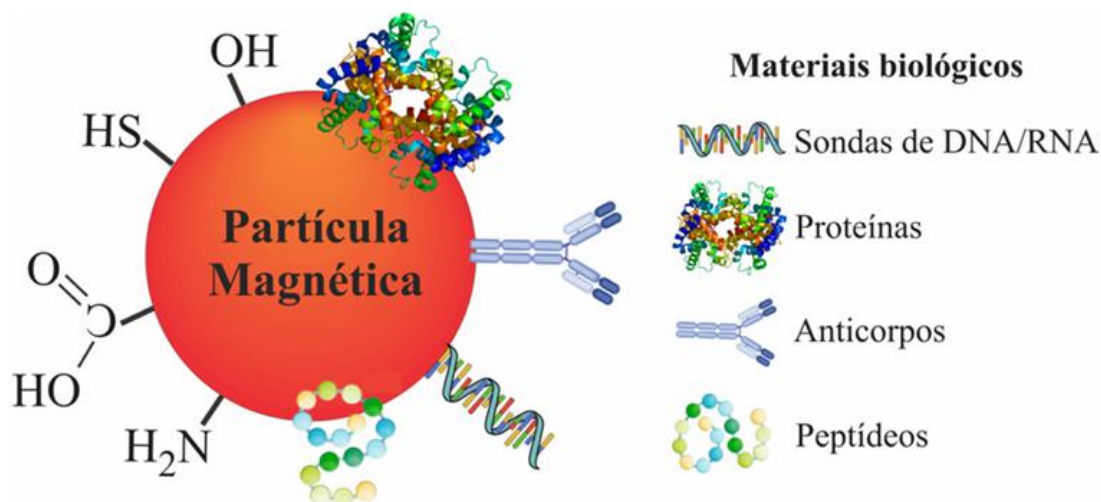


FIGURA 1.10 - Representação das PMs funcionalizadas e modificadas com diferentes materiais.

Fonte: Silva¹⁰⁶.

Graças à sua elevada área superficial, as PMs permitem a imobilização de grandes quantidades de biorreceptores, aumentando a chance de captura do alvo mesmo em baixas concentrações. Após a formação do imunocomplexo, um ímã externo permite separar rapidamente as partículas do meio reacional, removendo interferentes e pré-concentrando o analito em pequenos volumes. Esse processo resulta em sinais mais intensos e melhora significativamente a relação sinal/ruído¹¹⁰. Estratégias mais recentes vêm explorando a montagem do imunocomplexo diretamente em solução, com posterior transferência magnética para o eletrodo, simplificando etapas de lavagem e tornando o processo mais eficiente para aplicações em amostras clínicas¹¹¹

Já as nanopartículas de ouro (AuNPs) se destacam por sua elevada condutividade elétrica, estabilidade coloidal e biocompatibilidade. Sua superfície pode ser facilmente modificada por ligações Au-S ou Au-N, o que viabiliza a ancoragem estável de diversas biomoléculas. Quando incorporadas à superfície dos eletrodos — por técnicas como eletrodeposição, drop-casting ou monocamadas auto-organizadas — as AuNPs ampliam significativamente a área eletroativa, facilitando a transferência de carga e permitindo detectar alvos na faixa de concentração femtomolar. Em solução, AuNPs conjugadas a anticorpos ou enzimas podem atuar como marcadores eletroquímicos, fornecendo um sinal amplificado após a imunorreação, por meio da oxidação anódica do ouro ou de um marcador redox acoplado.

Além disso, conjugados de AuNPs com glutationa (AuNPs-GSH) demonstram excelente estabilidade e oferecem múltiplos pontos de ancoragem para biorreceptores, o que aumenta a densidade de sítios ativos e, conseqüentemente, a sensibilidade da detecção.

A combinação entre PMs e AuNPs tem gerado plataformas híbridas altamente eficientes, capazes de integrar captura seletiva, separação magnética e sinal eletroquímico amplificado, um exemplo disso foi o uso de magneto-ensaio para detecção do SARS-CoV-2 em saliva utilizou PMs funcionalizadas com um peptídeo para capturar a proteína spike¹¹². Nesse sistema, AuNPs ligadas a anticorpos forneceram o sinal voltamétrico, possibilitando a distinção entre amostras positivas e negativas sem necessidade de pré-tratamento.

De maneira semelhante, um estudo voltado para o diagnóstico de tuberculose desenvolveu um sistema para a detecção simultânea dos biomarcadores CFP-10 e ESAT-6, utilizando PMs revestidas com ouro. O ensaio alcançou sensibilidade e especificidade próximas de 100% em amostras de escarro.¹¹¹

Esses avanços demonstram o enorme potencial da sinergia entre nanomateriais para o desenvolvimento de imunossensores eletroquímicos portáteis, acessíveis e altamente eficazes, capazes de fornecer resultados em menos de 15 minutos. Tais características os colocam como fortes candidatos a ferramentas diagnósticas em contextos point-of-care, especialmente em regiões com infraestrutura laboratorial limitada¹¹⁰.

CAPÍTULO 2

Objetivos

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVO

2.1. Justificativa

As infecções fúngicas invasivas (IFIs) representam uma ameaça significativa à saúde, principalmente para indivíduos imunossuprimidos, como pacientes com HIV, transplantados, hospitalizados, com câncer ou em uso de imunossupressores. Diante desse cenário, torna-se fundamental o desenvolvimento de metodologias rápidas, sensíveis e acessíveis para a detecção precoce dessas infecções, permitindo intervenções terapêuticas mais eficazes e reduzindo a mortalidade. Os sintomas das IFIs são inespecíficos, incluindo febre persistente, fadiga, dificuldade respiratória e comprometimento sistêmico, o que dificulta o diagnóstico clínico. Além disso, os métodos convencionais, como microscopia óptica, histopatologia, cultivo fúngico, PCR e ELISA, apresentam limitações, como baixa sensibilidade, necessidade de múltiplos testes, o que demanda um alto investimento, resultando em atrasos no diagnóstico e no início do tratamento. Portanto, faz-se necessário o desenvolvimento de ensaios e dispositivos que sejam sensíveis, estáveis e precisos, além de aplicáveis em análises de rotina com elevada frequência analítica.

2.2. Objetivo Geral

Desenvolver um magneto- imunoensaio baseado em anticorpos anti-quito-oligômero para a captura seletiva da quitina, para auxiliar o diagnóstico rápido de infecções fúngicas.

2.3. Objetivos Específicos

- Promover a síntese de nanopartículas de ouro (AuNPs) que serão utilizadas como marcador eletroquímico.
- Realizar a funcionalização de partículas magnéticas comerciais (PMs) e AuNPs com os anticorpos anti-quito-oligômeros (mAb).
- Avaliar a reatividade do anticorpo anti-quito-oligômero produzido por Fiocruz Manguinhos, frente a amostra de levedura.
- Construir dispositivos microfluídicos serigrafados descartáveis e avaliar sua robustez e estabilidade;
- Desenvolver magneto-imunoensaios utilizando o anticorpo para detecção de quitina;

- Averiguar os melhores parâmetros incluindo as quantidades de PMs e AuNPs adicionadas, os tempos de incubação para a captura e quando da adição das AuNPs e os parâmetros eletroquímicos visando melhor diferenciação entre amostras positivas e negativas.
- Avaliar a capacidade das PMs para a captura e separação de fungos em extrato de lisados de fungos e em amostras soro de feto bovino fortificadas com quitina e lisados de fungos via a detecção eletroquímica com uso das AuNPs funcionalizadas.

CAPÍTULO 3

Metodología

3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1. Reagentes e Soluções

3.1.1. Reagentes

Os reagentes, todos de grau analítico, utilizados foram: ácido 2-N-morfolinoetanossulfônico (MES), ácido tetracloroáurico(III) tri-hidratado (99,9%), citrato trissódico, albumina de soro bovino (BSA, do inglês, bovine serum albumin), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), ácido ferroceno monocarboxílico, N-hidroxisuccinimida (NHS), Tween 20 (TW20), etanolamina (ETA) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA).

Fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4), fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4), cloreto de potássio (KCl), cloreto de sódio (NaCl) e hidróxido de sódio (NaOH) foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha).

As PMs funcionalizadas com grupo carboxílico (concentração de 10 mg mL⁻¹ e 1,0 µm de diâmetro) foram obtidas da Invitrogen (Dynabeads MyOne™ Carboxylic Acid, Prod. nº 65012, Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA). Tinta de carbono (C2160602D2) e tinta Ag/AgCl (C2130429D3) foram adquiridas da Gwent Electronic Materials Ltd., Reino Unido.

3.1.2. Soluções

Todos os reagentes utilizados no preparo das soluções eram de pureza analítica. A solução tampão fosfato salino (PBS) 10 mmol L⁻¹ era constituída de KCl 2,7 mmol L⁻¹, KH_2PO_4 1,8 mmol L⁻¹, NaCl 137 mmol L⁻¹ e Na_2HPO_4 10 mmol L⁻¹ e tampão MES 50 mmol L⁻¹ pH 6,0 foram preparados em água desionizada (Millipore, Bedford, EUA) e seu pH foi ajustado com HCl 0,1 mol L⁻¹ e NaOH 0,1 mol L⁻¹. A solução de EDC 0,4 mol L⁻¹ foi diluída em solução de NHS 0,1 mol L⁻¹ preparada em MES pH 6,0, ambas preparadas imediatamente antes do uso. Etanolamina 1,0 mol L⁻¹ foi preparada em água ultrapura, tendo seu pH ajustado com NaOH 0,1 mol L⁻¹ para 8,0.

3.2. Instrumento e Materiais

3.2.1. Equipamentos

As medidas voltamétricas foram realizadas em um multipotenciostato portátil µstat 8000 da DropSens (Espanha). O corte do vinil adesivo foi realizado

utilizando uma impressora de corte a laser da marca Two Trees. A separação dos AuNPs do sobrenadante foi realizada utilizando uma mini centrífuga (Modelo: Mini-6K, 32 ALLSHENG). A homogeneização das PMs foi realizada em banho ultrassônico (modelo: USC - 1400, UNIQUE) com agitador de tubo vórtice (modelo: AV-2 82328, GEHAKA). A preparação final do conjunto SPCE foi realizada com auxílio de uma Prensa Térmica (Modelo: PTM 38, F1 SUPPLIES - Brasil). Utilizou-se um pHmetro Digimed DM20 (Digimed, Brasil) para aferição de pH.

3.2.2. Material

O policloreto de vinila (PVC) e o vinil adesivo foram obtidos no comércio local de São Carlos/SP.

3.3. Preparo de Amostra

3.3.1. Leveduras

As leveduras tipo *Saccharomyces* e diferentes linhagens (FV3_13, FV3_10 e FV1) foram fornecidos pelo grupo do Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha, do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos.

As leveduras foram plaqueadas em ágar YPD com o auxílio de palitos esterilizados em uma placa de Petri. As leveduras foram incubadas por 48 horas em uma estufa com temperatura de 26°C. Em seguida, foi realizado raspagem com o auxílio de uma ponteira, as leveduras foram transferidas para 1 mL de solução de YPD líquido.

A solução foi incubada por 24 horas com agitação de 250 rpm em uma temperatura de 30°C, verificando a turbidez do meio. As leveduras foram centrifugadas a 5.000 rpm por 10 minutos a 24°C. Em seguida, o sobrenadante foi removido e adicionado uma quantidade de 10 mL de solução de PBS pH 7,4. Em seguida a solução foi aliqotado em micros tubos.

3.3.2. Determinação da Concentração Celular

Para a quantificação da concentração celular foi utilizada duas metodologias diferentes, a primeira utilizando Espectrofotometria UV-Vis e a segunda contagem direta em câmara de Neubauer.

3.3.2.1. Método por Espectrofotometria UV-Vis

A determinação do crescimento microbiano foi realizada por meio da medição da densidade óptica (DO) a 600 nm (DO600), utilizando um espectrofotômetro. Inicialmente, foi removido da colônia uma alíquota de 1 mL e transferido para uma cubeta de quartzo com 10 mm.

O equipamento foi calibrado com meio de cultivo puro como branco antes de cada leitura. Os dados obtidos foram analisados usando a relação da EQUAÇÃO 3.1¹¹³.

$$1 (OD600) = 1,5 \times 10^5 \text{ células mL}^{-1} \text{ (EQUAÇÃO 3.1)}$$

3.3.2.2. Método por Contagem Direta em Câmara de Neubauer

A quantificação celular foi realizada por contagem direta utilizando a câmara de Neubauer. Inicialmente, uma alíquota de 10 µL da cultura foi coletada e diluída em PBS estéril, em seguida diluída 1 para 100, evitando sobreposição de células na câmara.

Antes da contagem, a câmara de Neubauer e a lamínula foram cuidadosamente limpas com álcool 70% e secas com papel absorvente para evitar contaminação ou interferências na leitura. Em seguida, 10 µL da amostra foram pipetados na câmara, garantindo o preenchimento homogêneo da área delimitada pela lamínula sem formação de bolhas de ar.

A câmara foi então visualizada em microscópio óptico utilizado para observação das células nos quadrantes centrais e laterais do retículo. A contagem foi realizada em pelo menos cinco quadrantes da câmara, seguindo o critério de contagem de células que tocam as bordas superior e esquerda dos quadrantes, enquanto as das bordas inferior e direita foram excluídas para evitar dupla contagem.

O número total de células por mililitro da amostra foi calculado utilizando a EQUAÇÃO 3.2, na qual C é Concentração celular (células/mL), N o Número total de células contadas, D o Fator de diluição da amostra, Q o Número de quadrantes contados e 10^4 o Fator de conversão baseado no volume da câmara.

$$C = \frac{N \times D \times 10^4}{Q} \text{ (EQUAÇÃO 3.2)}$$

3.3.3. Congelamento de leveduras

A preservação das culturas de leveduras foi realizada por meio de congelamento em -80°C com glicerol. Inicialmente a cultura foi centrifugada a 5.000 rpm por 10 minutos para a separação do sobrenadante. O pellet celular foi ressuscitado em PBS pH 7,4 e glicerol a 20% (v/v), A suspensão foi então alíquota em microtubos. Os tubos foram imediatamente submetidos a um processo de congelamento gradual, sendo inicialmente resfriados a -4°C por 30 minutos, seguida de -20°C por 1 horas e, em seguida transferidos para um ultra-freezer a -80°C para armazenamento definitivo.

O descongelamento das leveduras foi realizado rapidamente em banho-maria a 37°C por 2 minutos.

3.3.4. Quitina

A quitina na forma de coloidal foi doada pela professora Dra. Dulce Helena Ferreira de Souza do departamento de química da Universidade Federal de São Carlos.

Após a pesagem, a solução de quitina foi diluída em tampão PBS (pH 7,4) até atingir a concentração desejada.

3.3.5. Lisado celular

O lisado celular foi obtido a partir de uma amostra de 5 mL de leveduras, com concentração previamente determinada, em tampão PBS (pH 7,4). A amostra foi submetida à sonicação com uma ponta de sonicador, ajustada para 60% de amplitude. Ondas ultrassônicas foram aplicadas à suspensão celular com frequência de 20 kHz, em ciclos de 15 segundos, intercalados com intervalos de 30 segundos para evitar o superaquecimento. Durante todo o processo, a amostra foi mantida em banho de gelo. O procedimento foi repetido aproximadamente 10 vezes, até que a lise celular fosse completa. O lisado foi, então, armazenado a -20°C para garantir sua estabilidade.

3.3.6. Anticorpo anti-quito-oligômeros (mAb)

O Anticorpo monoclonal anti-quito-oligômeros (mAb, do inglês monoclonal antibody), foi produzido por meio da técnica de hibridoma, o anticorpo DD11 foi desenvolvido pela Fiocruz Manguinhos¹¹⁴.

O Anticorpo foi aliqotados em PBS pH 7,4 nas concentrações de 0,2 mg mL⁻¹ em microtubos, em sequência um microtubo foi diluído e aliqotado à concentração de 5 µg mL⁻¹ em PBS pH 7,4. Todas as alíquotas foram mantidas em -80°C até o uso.

3.4. Síntese das nanopartículas de ouro estabilizadas com citrato (AuNPs)

A síntese de nanopartículas de ouro estabilizadas com citrato foi realizada com base no método Turkevich¹¹⁵ no qual será utilizado citrato como agente redutor e estabilizador, fornecendo carga negativa para a superfície das nanopartículas, prevenindo a aglomeração das partículas.

A síntese foi realizada partindo-se de uma solução de 200 mL HAuCl₄·3H₂O (0,01% m/v) preparada em água ultrapura foi aquecida sob agitação até o ponto de ebulição. Em seguida, 5,0 mL de solução de citrato de sódio 40,0 mmol L⁻¹ foi adicionada à solução através de um funil de separação à solução e a mistura foi mantida sob agitação por 5 minutos ocasionando a mudança de cor da solução, do amarelo para vermelho escuro, FIGURA 3.1. Após esta etapa, a solução será mantida sob agitação e sem aquecimento até atingir a temperatura ambiente. A dispersão contendo as AuNPs sintetizadas foi armazenada protegida da luz e sob refrigeração até o uso.

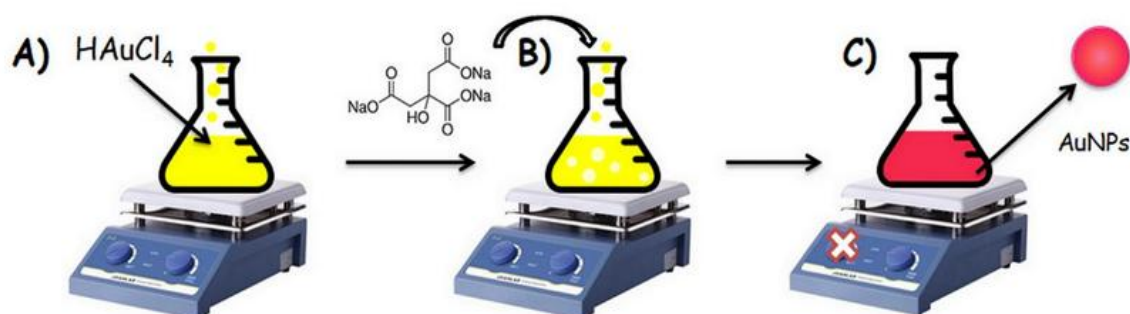


FIGURA 3.1- Etapas envolvidas na síntese das AuNPs: A) Aquecimento sob agitação até ebulição. B) Adição da solução de citrato de sódio. C) Interrupção do aquecimento e formação das AuNPs.

Fonte: Fonseca¹¹⁶.

3.5. Construção Dos Eletrodos Descartáveis (SPEs)

Os eletrodos foram construídos pela técnica de serigrafia, já utilizada em nosso grupo previamente relatado na literatura¹¹⁷⁻¹¹⁹. A célula eletroquímica, composta de 8 eletrodos de trabalho (WE) à base de carbono não modificado com 3 mm de diâmetro, um eletrodo de pseudo-referência de Ag/AgCl (RE) e um contra

eletrodo (CE) que foram projetados utilizando o software LightBurn, o molde será então cortado por meio de uma impressora de corte a laser em um adesivo vinílico.

Após o corte, as partes indesejadas foram removidas, o vinil foi transferido sobre uma lâmina de PVC (policloreto de vinila, do inglês poly-vinyl chloride) e foi utilizado como máscara negativa para deposição da tinta condutora de carbono com auxílio de uma espátula. Logo após será realizado a cura da tinta de carbono por meio de tratamento térmico à 60°C por 60 minutos. Para o eletrodo de referência após a deposição e cura da tinta de carbono, a tinta de Ag/AgCl é aplicada sobre a tinta de carbono, com auxílio de um pincel, seguida de mais uma etapa de cura por 30 minutos a 60°C.

Por fim, o vinil adesivo é removido. Sobre o sistema, será aderida uma capa produzida com vinil, de modo que apenas a área eletroativa dos eletrodos fique exposta, então o eletrodo foi prensado em uma prensa térmica na temperatura de 120°C por 130 segundos. Nas costas de cada um dos eletrodos será posicionada um ímã para a retenção magnética das partículas sobre a superfície do eletrodo. A representação do procedimento de fabricação de SPCE é apresentada na FIGURA 3.2.

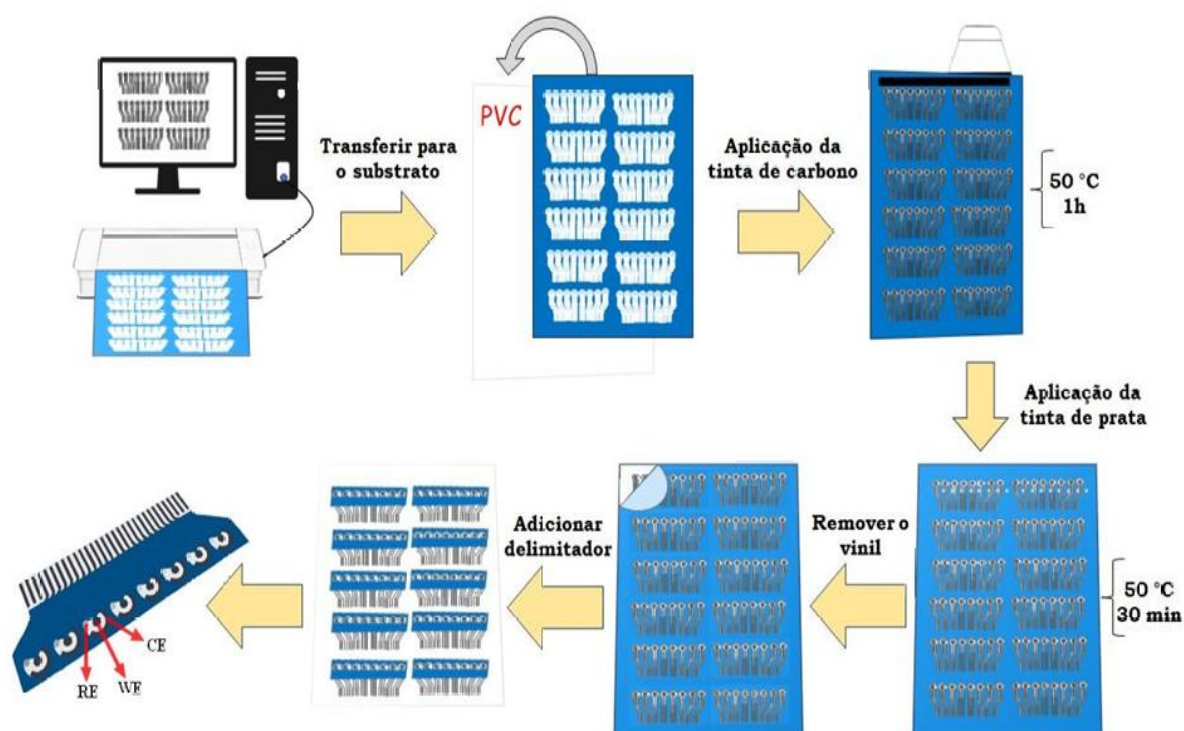


FIGURA 3.2 - Representação esquemática da fabricação dos SEDs com as seguintes etapas: Recorte do adesivo de baixa aderência; Serigrafia dos eletrodos com tinta de carbono; Pintura dos

REs utilizando tinta de Ag/AgCl; Remoção do adesivo; Adição de máscara; Aquecimento do SED em prensa térmica; Adição de ímãs de neodímio na parte de trás dos WEs.

Fonte: Nascimento¹²⁰.

3.6. Conjugação das AuNPs com o anticorpo anti-quito-oligômeros (mAb)

As AuNPs sintetizadas, descrita no item 3.5, foram conjugadas com anticorpo anti-quito-oligômero, formando o conjugado AuNPs-mAb.

Em um microtubo foi transferido 1 mL da solução de dispersão de AuNPs e centrifugada a 6.000 rpm por 30 minutos a 24°C. Em seguida, o sobrenadante foi removido e uma quantidade de 900 µL de solução de EDC/NHS (0,4 mol L⁻¹ e 0,1 mol L⁻¹, respectivamente) preparada em água pura foi adicionada, FIGURA 3.3. A dispersão foi deixada sob agitação lenta durante 1 hora em temperatura ambiente, seguida de centrifugação, 6.000 rpm por 30 minutos, e remoção do sobrenadante. Após isso, adicionou 1 mL de solução tampão PBS à mistura, que foi novamente centrifugada com os mesmos parâmetros. Esse procedimento foi repetido três vezes.

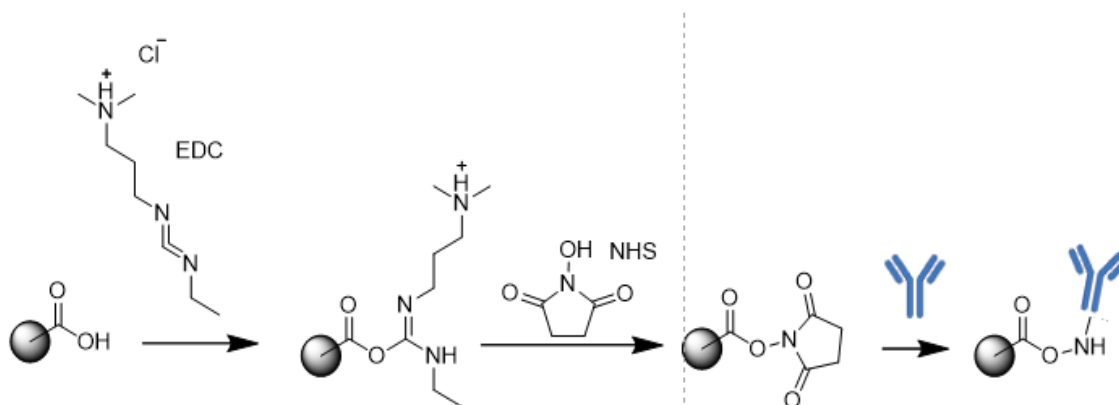


FIGURA 3.3 - Imobilização do anticorpo nas AuNPs utilizando EDC/NHS

Em seguida adicionou 1 mL da solução de anticorpo (5 µg mL⁻¹), a dispersão foi deixada sob agitação lenta durante 18 horas em temperatura ambiente. As AuNPs foram lavadas com PBS-Tween 20 0,05% (m/v) três vezes para retirada de anticorpos não ancorados às AuNPs. Por fim, foi realizado o bloqueio dos sítios de ligação não específicos utilizando 1,0 mol L⁻¹ de etanolamina (ETA) pH 8,0 durante 1 hora em agitação lenta em temperatura ambiente, seguida por BSA 0,1% em PBS pH 7,4 por 30 minutos em temperatura ambiente, FIGURA 3.4.

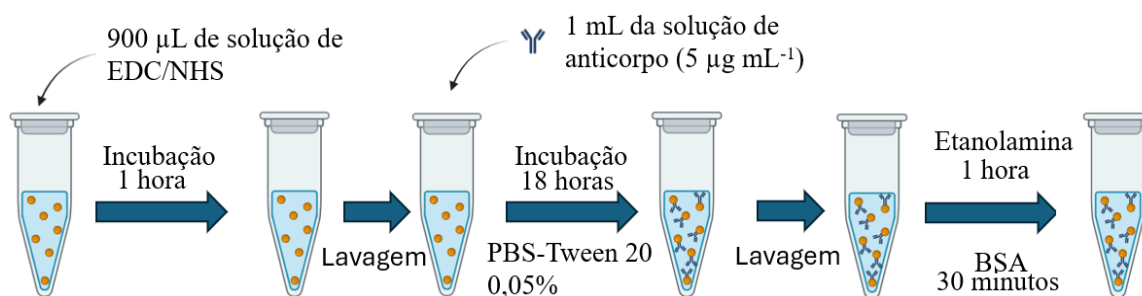


FIGURA 3.4 – Etapas envolvidas na Formação AuNPs: Adição EDC/NHS; Incubação; Lavagem; Adição do Anticorpo; Incubação de 18 horas; lavagem; e bloqueio com ETA e BSA.

Fonte: Do autor

3.7. Conjugação das PMs com o anticorpo anti-quito-oligômeros (mAb)

As partículas magnéticas (PMs) comerciais (Dynabeads MyOne Carboxylic Acid, Invitrogen com diâmetro médio de 1 μm) contendo grupos carboxílicos foram modificadas seguindo o protocolo do fabricante^{121,122} com adaptações., na FIGURA 3.6 é apresentada o esquema do processo de formação do conjugado PMs-mAb.

Inicialmente, o frasco das PMs comerciais foi agitado em *Shaker* a 1000 rpm por 15 minutos à 25°C e uma alíquota de 100 μL de PMs foram lavadas com 1 mL de tampão MES (50 mmol L^{-1} pH 5,2). As PMs foram separadas magneticamente com auxílio de um suporte magnético com ímãs fixados nas laterais. Após a separação magnética e remoção do sobrenadante, foi adicionado 1 mL de uma solução de EDC/NHS (0,4 mol L^{-1} e 0,1 mol L^{-1} , respectivamente) preparada em MES. A dispersão foi deixada sob agitação lenta durante 30 minutos em temperatura ambiente. As PMs foram novamente separadas magneticamente por meio de uma estante de separador magnético, FIGURA 3.5 e o sobrenadante foi descartado e lavado com tampão MÊS, o processo de lavagem foi realizado três vezes.

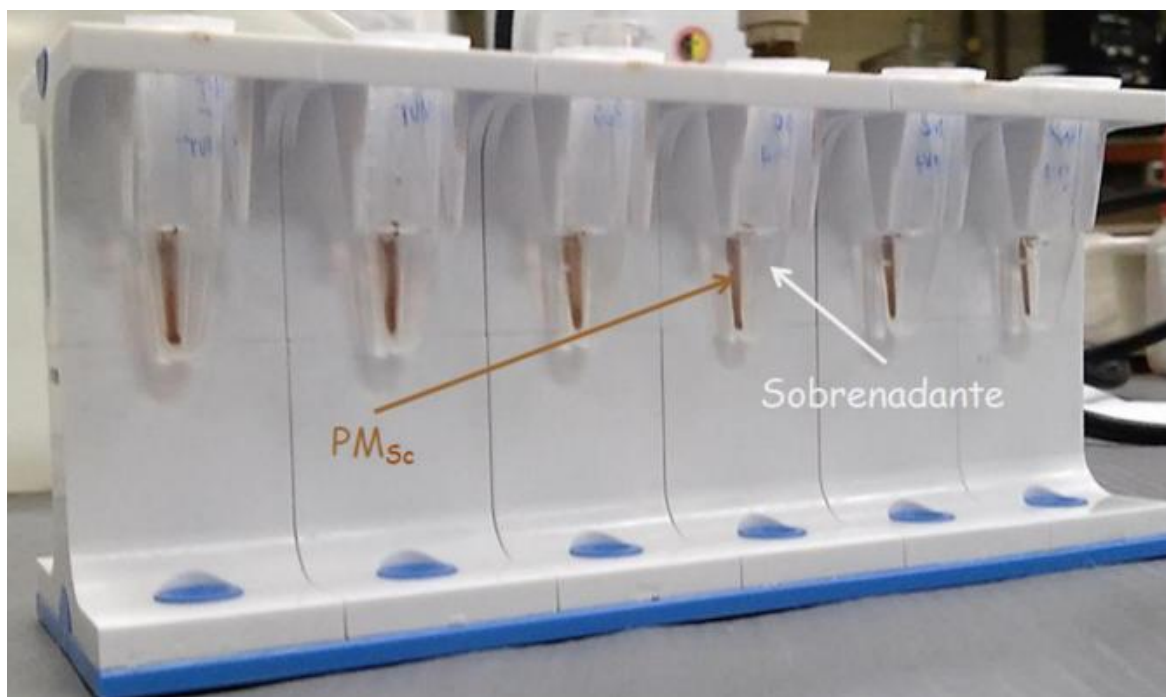


FIGURA 3.5 - Fotografia do separador magnético utilizado na bioconjugação das PMs.

Fonte: Fonseca¹¹⁶.

O anticorpo ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$), foi adicionado em seguida e mantido sob agitação lenta durante 24 horas em temperatura ambiente. As PMs foram lavadas com PBS-Tween 20 0,05% (m/v) três vezes para retirada de anticorpos não ancorados. Por fim, foi realizado o bloqueio dos sítios de ligação não específicos utilizando $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ de etanolamina pH 8,0 durante 1 hora, seguida por BSA 0,1% em PBS pH 7,4 por 30 min.

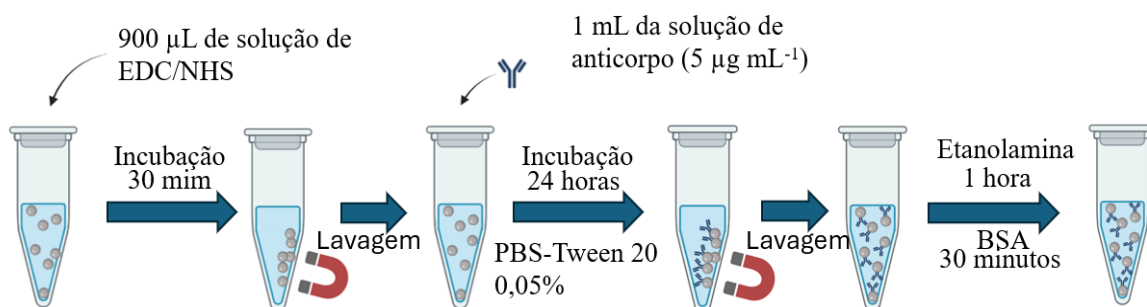


FIGURA 3.6 - Etapas envolvidas na Formação AuNPs: Adição EDC/NHS; Incubação; Lavagem; Adição do Anticorpo; Incubação de 18 horas; lavagem; e bloqueio com ETA e BSA.

3.8. Variação de bloqueio

No intuito de avaliar qual seria o melhor tipo de bloqueio utilizado no Magneto-imunoensaio a fim de distinguir de forma eficiente o sinal do branco analítico do positivo foi utilizado três métodos de bloqueio.

A conjugação do anticorpo anti-quito-oligômeros (mAb) foi realizada conforme descrito no item 2.7 e 2.8 para AuNPs e PMs, respectivamente. Após a

imobilização do anticorpo, as partículas foram submetidas a um procedimento de lavagem e bloqueio com: apenas uma etapa com BSA 0,1% preparado em PBS pH 7,4 por 30 min, utilizando apenas uma etapa com ETA 1,0 mmol L⁻¹ preparada em PBS pH 7,4 por 1 h, e utilizando duas etapas consecutivas. No método de duas etapas, foi verificado das duas formas possíveis, iniciado com uma solução de BSA 0,1% em PBS pH 7,4 por 30 min, seguido da adição de uma solução de ETA 1 mmol L⁻¹ em PBS pH 7,4 por 1 h e invertida começando com a solução de ETA 1 mmol L⁻¹ em PBS pH 7,4 por 1 h, seguida da adição de BSA 0,1% em PBS pH 7,4 por 30 min.

3.9. Magneto-imunoensaio para determinação de quitina

A detecção de quitina (Ch) nas amostras de leveduras e lisado foram realizadas em duas etapas, a primeira etapa sendo ela de captura, com o uso de PMS-mAb, descrito no item 3.9 e a segunda etapa a de detecção do alvo com o uso de AuNPs-mAb, descrito no item 3.8. A FIGURA 3.7 apresenta as etapas que envolveram as capturas magnéticas do alvo em amostra de PBS e fortificada com BSA.

Inicialmente foi adicionado 15 µL do conjugado PMS-mAb em um microtubo contendo 25 µL de solução padrão com a concentração desejada de quitina, levedura ou lisado celular.

Nos estudos com amostras fortificadas com BSA, o conjugado foi adicionado a 25 µL de amostras previamente diluídas em BSA foram adicionados a 320 µL de PBS (pH 7,4) a fim de obter a concentração desejada. Para os ensaios de controle (branco), 15 µL de PMS-mAb foram adicionados a 25 µL de PBS pH 7,4.

A mistura foi então incubada sob agitação lenta por 15 minutos em temperatura ambiente, levando a formação do bioconjugado PMS-mAb/Ch, em seguida o bioconjugado foi separado magneticamente e o sobrenadante foi descartado e lavado com PBS-Tween 20 0,05% (m/v), o processo de lavagem foi realizada três vezes.

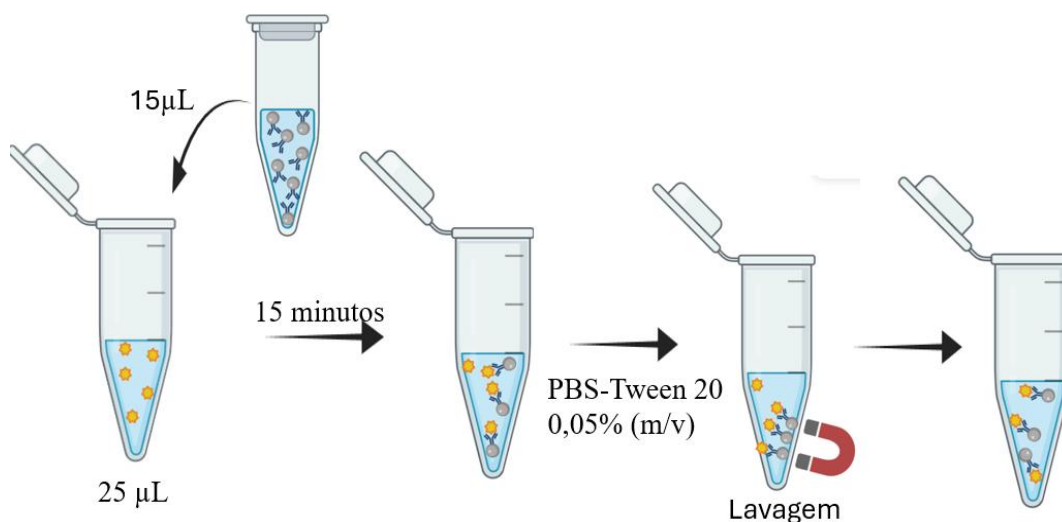


FIGURA 3.7 - Etapas envolvidas na etapa de captura, na formação do biconjugado PMS-mAb/Ch.

Posteriormente, adicionou 250 μL de AuNPs-mAb no bioconjugado formado, conforme a FIGURA 3.8, a dispersão foi mantida em agitação lenta por 90 minutos em temperatura ambiente levando a formação do bioconjugado PMS-mAb/Ch/mAb-AuNPs. Após a incubação, as PMs foram separadas magneticamente, o sobrenadante foi removido e lavado com PBS-Tween 20 0,05% (m/v), o processo de lavagem foi realizado três vezes. Por fim, o bioconjugado foi redisperso em 100 μL de PBS pH 7,4 para posteriormente ser aplicado no SPCE, para a detecção eletroquímica de quitina.

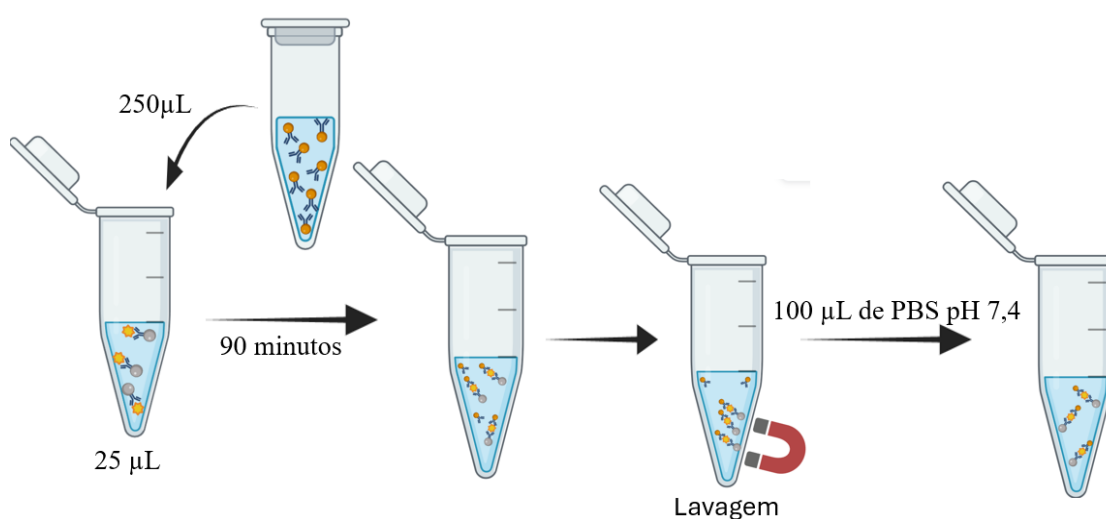


FIGURA 3.8 - Etapas envolvidas na etapa de detecção, na formação do biconjugado PMS-mAb/Ch/mAb-AuNPs.

3.10. Estudo de repetibilidade

A precisão do Magneto-imunoensaio foi avaliada de três maneiras: análise de 5 réplicas de um arranjo; análise de 5 réplicas de 3 dispositivos construídos no mesmo dia; e análise de 5 réplicas de 3 dispositivos, cada um construído em um dia diferente. Os resultados foram expressos em termos de desvio padrão relativo DPR (%) conforme definido pela EQUAÇÃO 3.3, sendo: DP o desvio padrão e \underline{X} a média.

$$DPR (\%) = \left(\frac{DP}{\underline{X}} \right) \text{ (EQUAÇÃO 3.3)}$$

3.11. Medidas eletroquímicas com os SPCE

A caracterização dos eletrodos, estudos de repetitividade e estimativa da área eletroativa dos eletrodos foi realizada utilizando uma solução AFM (ácido ferroceno monocarboxílico) pH 8,0 e KCl 0,5 mol L⁻¹ usando técnica de CV (Voltametria Cíclica), aplicando um intervalo de potencial de -0,2 a +0,6 V.

Os estudos eletroquímicos para a detecção de Ch foram realizados empregando a técnica de DPV (Voltametria de Pulso Diferencial do inglês, Differential Pulse Voltammetry). Os parâmetros eletroquímicos otimizados da DPV foram: potencial de condicionamento (Econd) de 1,25 V, tempo de condicionamento (tcond) de 120 s, potencial de deposição (Edep) de 0 V e tempo de deposição (tdep) de 0 s. O tempo de equilíbrio (tequil) foi estabelecido em 3 s antes do início da varredura.

As medidas foram realizadas na faixa de potencial entre 1,25 V e -0,2 V, com incremento de potencial (Estep) de 0,004 V, amplitude de pulso (Epuls) de 0,05 V e tempo de pulso (tpuls) de 10 ms. A taxa de varredura (Srate) foi ajustada para 0,034 V/s. A FIGURA 3.9, apresenta todo o sistema utilizado no método eletroanalítico utilizando os SPCE para a detecção de Quitina.



FIGURA 3.9 - Foto do sistema eletroquímico utilizado para a detecção de quitina utilizando o SED.

Fonte: Adaptado de Fonseca¹¹⁶.

O sistema eletroquímico apresentado na FIGURA 3.9 foi utilizado para toda a realização de todas as medidas eletroquímicas realizadas neste trabalho. Para a análise de Ch foi utilizado uma alíquota de 10,0 μL da dispersão contendo o bioconjugado PMS-mAb/Ch/mAb-AuNPs, item 2.10, foi adicionada em cada WE do arranjo de 8 eletrodos do SPCE, item 2.6. O ímã que foram posicionados do lado oposto de cada WE permite a captura e retenção do bioconjugado sobre a superfície de cada WE. Em seguida foi adicionado 20 μL de uma solução de HCl 0,2 mol L⁻¹ à cada célula, para atuar como eletrólito de suporte nas medidas eletroquímicas. Posteriormente, foi aplicado um potencial de +1,25 V vs. Pseudo-referência de Ag/AgCl durante 120 segundos, visando obter o sinal analítico referente ao processo redox do ouro presente AuNPs-mAb ligadas em quitina ancoradas nas PMs.

3.12. Planejamento Fatorial

Com a utilização de um planejamento fatorial PCC (Planejamento Central Composto), por meio dessa metodologia foi possível otimizar as condições do magneto-imunoensaio na determinação de quitina. Este tipo de planejamento avalia os efeitos lineares e interativos entre as variáveis, mas também os efeitos quadráticos, possibilitando a identificação de pontos ótimos do sistema estudado.

Desse modo foi possível ter uma abordagem estatística eficiente para identificar os parâmetros mais influentes em um experimento, especialmente quando há um grande número de variáveis, permitindo a avaliação dos efeitos principais com um número reduzido de ensaios.

Deste modo, foram avaliadas 6 variáveis reais ($n=6$), sendo desse modo realizados 79 experimentos. Para a avaliação das variáveis reais, foram considerados dois níveis (um baixo (-1) e um alto (+1)), e pontos axiais ($-\alpha$, $+\alpha$). As variáveis reais estão apresentadas na TABELA 3.1, bem como os valores reais utilizados no estudo.

Inicialmente, para cada variável, definiu-se um ponto central com base em experimentos piloto. Em seguida, estabeleceu-se um percentual de variação relativo ao ponto central de 30%, que permitiu definir os níveis baixos e altos por meio das EQUAÇÃO 3.4.

$$X_{nível} = X_{central} \times (1 \pm \text{percentual}) \text{ (EQUAÇÃO 3.4)}$$

Essas equações garantem que os limites operacionais da variável estejam simetricamente distribuídos em torno do valor central, permitindo uma exploração consistente da região experimental. Adicionalmente, para ampliar a capacidade do modelo em captar efeitos quadráticos, foram calculados os pontos axiais. Os pontos axiais foram determinados por meio da EQUAÇÃO 3.5.

$$\pm\alpha = X_{central} \pm (\text{percentual} \times \text{Ponto Central} \times 1.41) \text{ (EQUAÇÃO 3.5)}$$

Para Calcular desse modo os pontos axiais foi utilizado o fator 1.41 (aproximadamente $\sqrt{2}$) a qual foi utilizada para posicionar os pontos axiais a uma distância adequada do ponto central, de modo a garantir a rotatividade e a esfericidade do desenho experimental¹²³⁻¹²⁵.

TABELA 3.1 -Variáveis reais de acordo utilizados no planejamento e os respectivos níveis codificados.

	Variável	Axial Inferior (-α)	Nível Baixo (-1)	Condição Padrao (0)	Nível Alto (+1)	Axial Superior (+α)
V1	C_{PM} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	8,66	10,5	15	19,5	21,34
V2	$C_{\text{Anticorpo-PMs}}$ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	2,88	3,5	5	6,5	7,12
V3	C_{AuNP} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	28,16	34,16	48,8	63,44	69,44
V4	$C_{\text{Anticorpo-AuNPs}}$ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	2,88	3,5	5	6,5	7,12
V5	Tempo da 1 ^o incubação (min)	17,31	21	30	39	42,69
V6	Tempo da 2 ^o incubação (min)	34,62	42	60	78	85,38

As variáveis analisadas foram: a concentração de PMs a serem modificadas (C_{PMs} , variável 1), a concentração de anticorpo a ser imobilizada na superfície das PMs ($C_{\text{Anticorpo-PMs}}$, variável 2), Concentração de AuNPs a serem modificadas (C_{AuNPs} , variável 3), a concentração de anticorpo a ser imobilizada na superfície das AuNPs ($C_{\text{Anticorpo-AuNPs}}$, variável 4), o tempo de incubação entre o bioconjugado PMs-mAb com Ch (Tempo da 1^o incubação, variável 5), o tempo de incubação entre o bioconjugado PMs-mAb/Ch com AuNPs-mAb, formando o bioconjugado final. (Tempo da 2^o incubação, variável 6).

O planejamento fatorial 2⁶ com ponto central, sendo realizados experimentos de 1 a 64, de forma que do experimento 65 ao 67 são réplicas realizadas no ponto central e os experimentos de 68 a 79 representam os pontos axiais (variáveis codificadas nos níveis $-\alpha$ e $+\alpha$). A TABELA 3.2 mostra as condições de cada experimento realizado, incluindo os níveis codificados para cada variável.

TABELA 3.2 - Experimento do planejamento PCC com as variáveis codificadas.

Experimento	V1	V2	V3	V4	V5	V6
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
2	-1	-1	-1	-1	-1	+1
3	-1	-1	-1	-1	+1	-1
4	-1	-1	-1	-1	+1	+1
5	-1	-1	-1	+1	-1	-1
6	-1	-1	-1	+1	-1	+1
7	-1	-1	-1	+1	+1	-1
8	-1	-1	-1	+1	+1	+1
9	-1	-1	+1	-1	-1	-1

10	-1	-1	+1	-1	-1	+1
11	-1	-1	+1	-1	+1	-1
12	-1	-1	+1	-1	+1	+1
13	-1	-1	+1	+1	-1	-1
14	-1	-1	+1	+1	-1	+1
15	-1	-1	+1	+1	+1	-1
16	-1	-1	+1	+1	+1	+1
17	-1	+1	-1	-1	-1	-1
18	-1	+1	-1	-1	-1	+1
19	-1	+1	-1	-1	+1	-1
20	-1	+1	-1	-1	+1	+1
21	-1	+1	-1	+1	-1	-1
22	-1	+1	-1	+1	-1	+1
23	-1	+1	-1	+1	+1	-1
24	-1	+1	-1	+1	+1	+1
25	-1	+1	+1	-1	-1	-1
26	-1	+1	+1	-1	-1	+1
27	-1	+1	+1	-1	+1	-1
28	-1	+1	+1	-1	+1	+1
29	-1	+1	+1	+1	-1	-1
30	-1	+1	+1	+1	-1	+1
31	-1	+1	+1	+1	+1	-1
32	-1	+1	+1	+1	+1	+1
33	+1	-1	-1	-1	-1	-1
34	+1	-1	-1	-1	-1	+1
35	+1	-1	-1	-1	+1	-1
36	+1	-1	-1	-1	+1	+1
37	+1	-1	-1	+1	-1	-1
38	+1	-1	-1	+1	-1	+1
39	+1	-1	-1	+1	+1	-1
40	+1	-1	-1	+1	+1	+1
41	+1	-1	+1	-1	-1	-1
42	+1	-1	+1	-1	-1	+1
43	+1	-1	+1	-1	+1	-1
44	+1	-1	+1	-1	+1	+1
45	+1	-1	+1	+1	-1	-1
46	+1	-1	+1	+1	-1	+1
47	+1	-1	+1	+1	+1	-1
48	+1	-1	+1	+1	+1	+1
49	+1	+1	-1	-1	-1	-1
50	+1	+1	-1	-1	-1	+1
51	+1	+1	-1	-1	+1	-1
52	+1	+1	-1	-1	+1	+1
53	+1	+1	-1	+1	-1	-1
54	+1	+1	-1	+1	-1	+1
55	+1	+1	-1	+1	+1	-1
56	+1	+1	-1	+1	+1	+1
57	+1	+1	+1	-1	-1	-1
58	+1	+1	+1	-1	-1	+1
59	+1	+1	+1	-1	+1	-1
60	+1	+1	+1	-1	+1	+1

61	+1	+1	+1	+1	-1	-1
62	+1	+1	+1	+1	-1	+1
63	+1	+1	+1	+1	+1	-1
64	+1	+1	+1	+1	+1	+1
65	0	0	0	0	0	0
66	0	0	0	0	0	0
67	0	0	0	0	0	0
68	$-\alpha$	0	0	0	0	0
69	α	0	0	0	0	0
70	0	$-\alpha$	0	0	0	0
71	0	α	0	0	0	0
72	0	0	$-\alpha$	0	0	0
73	0	0	α	0	0	0
74	0	0	0	$-\alpha$	0	0
75	0	0	0	α	0	0
76	0	0	0	0	$-\alpha$	0
77	0	0	0	0	α	0
78	0	0	0	0	0	$-\alpha$
79	0	0	0	0	0	α

A variável dependente analisada foi a diferença entre o sinal referente ao branco e ao padrão ($-\Delta I$), como mostrado na EQUAÇÃO 3.6.

$$-\Delta I (nA) = I_{Branco} - I_{padr\tilde{a}o} \quad (\text{EQUAÇÃO 3.6})$$

Os experimentos apresentados na TABELA 4.1 foram realizados em ordem aleatória para evitar erros sistemáticos. Além disso, foram fixados os seguintes parâmetros para a realização das medidas eletroquímicas: concentração de quitina, volume de bioconjugado adicionado no WE, volume de HCl 0,2 mol L⁻¹ adicionado nos WE.

Com base nos resultados obtidos para cada experimento, foi calculado um modelo de regressão linear, utilizando o software livre Octave, na versão Guide user interface (GUI), com a rotina computacional “regression2”¹²⁶. Posteriormente adquirido a equação que representa o modelo, pode-se construir os gráficos de contorno, utilizando um template fornecido por Pereira e Pereira-Filho¹²⁶ no Excel, de forma que se verificou as regiões de resposta máxima.

CAPÍTULO 4

Resultados e discussão

4. Resultado e discussão

4.1. Caracterização eletroquímica do SPEs

A avaliação dos SPCEs construídos foi realizada por meio de medida eletroquímica utilizando a técnica de voltametria cíclica (VC), utilizando uma solução de ácido ferroceno monocarboxílico $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ preparada em $\text{KCl } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$. As medidas de CV foram realizadas após a adição de $10,0 \mu\text{L}$ desta solução em cada uma das oito células eletroquímicas (CE) de um único SPE e em várias velocidades de varreduras (FIGURA 4.1).

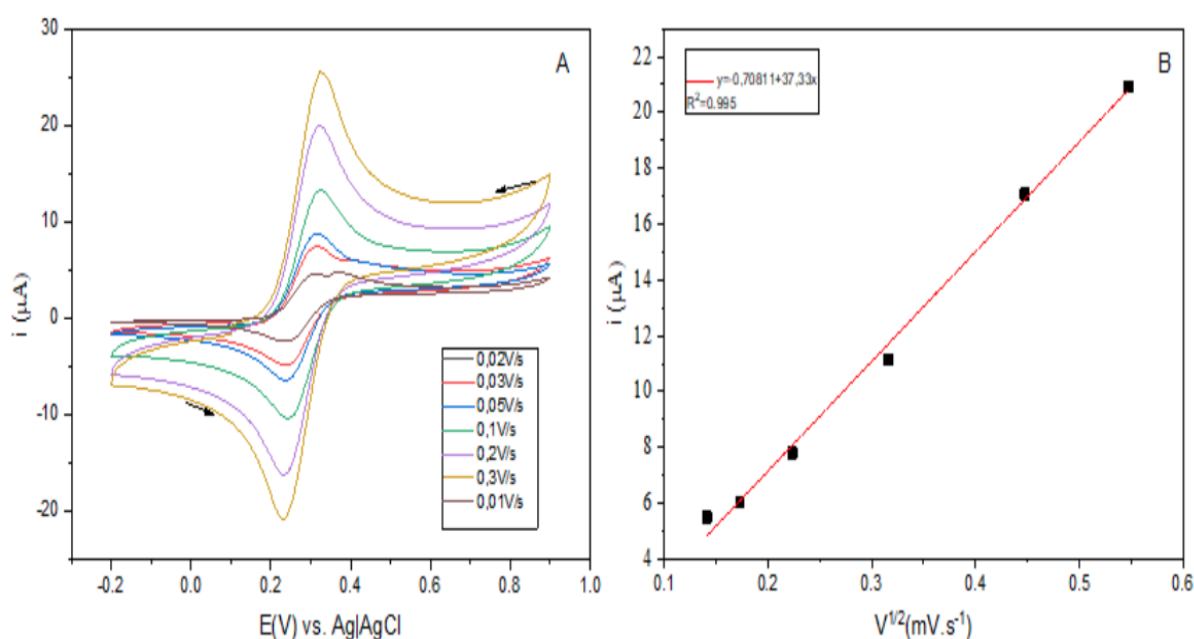


FIGURA 4.1 – A) Voltamogramas cíclicos obtidos, contendo FMA ($1,0 \text{ mmol L}^{-1}$) em solução aquosa $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ KCl (pH 8,0) usando arranjo SPCE com 8 células independentes com velocidades de varredura variando de 10 a 300 mV s^{-1} . B) corrente de pico anódica vs. $v^{1/2}$.

A velocidade de varredura (v) foi variado de 10 a 300 mV s^{-1} (FIGURA 4.1- B), os valores das corrente de pico anódica (i_{pa}) foram observados em relação com a raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$).

A diferença entre os potenciais de pico anódico (E_{pa}) e catódico (E_{pc}) em todas as velocidades de varredura foi de aproximadamente 33 mV ; esse valor foi inferior ao valor esperado para processos reversíveis (aproximadamente 59 mV)^{127,128} entretanto, consistente com estudos em SPCEs¹²⁹ os quais apresentam que os valores de $\Delta E_{pa-E_{pc}}$ entre 30 a 40 mV . A relação entre as correntes de pico anódica e catódica (i_{pa}/i_{pc}) em cada velocidade de varredura avaliada foi próxima de 1, confirmando a reversibilidade cinética do sistema¹²⁸. Esses dados reforçam

que a arquitetura dos SPCEs favorece processos redox quasi-reversíveis, adequados para aplicações analíticas¹³⁰.

Foi observado relação linear entre i_{pa} e $v^{1/2}$ como representado na (FIGURA 4.1- B) com uma correlação linear (r) de 0,995, representado por meio da equação: $i_p (\mu A) = 0,708 + 37,33x (v^{1/2}) (mV s^{-1})^{1/2}$. Utilizando a equação de Randles-Sevcik, conforme apresentado abaixo, EQUAÇÃO 4.1.

$$i_p = \pm(2,69 \times 10^5) \times n^{3/2} \times A \times D^{1/2} \times C \times v^{1/2} \text{ (EQUAÇÃO 4.1)}$$

Em que i_p é a corrente de pico (A), n é o número de elétrons da reação, A é a área eletroativa (cm^2), D é o coeficiente de difusão do ácido ferroceno monocarboxílico em solução de KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ($5,7 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$), v é a velocidade de varredura de potencial ($V s^{-1}$), e C é a concentração do ácido ferroceno monocarboxílico em solução (mol cm^{-3}).

4.2. Precisão e Repetibilidade do SPCE

A precisão e repetibilidade do dispositivo foi avaliada em três níveis: no mesmo dia (intradia), usando arranjos diferentes de eletrodos, entre dias (interdia), intradispositivo, usando as oito células eletroquímicas (CE) de um único SPCE.

A avaliação foi realizada por medidas eletroquímicas utilizando uma solução de ácido ferroceno monocarboxílico $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ preparada em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$.

Os resultados obtidos podem ser observados nos gráficos de barra, o intradispositivo (FIGURA 4.2) o desvio padrão relativo (RSD) foi de 2,82% entre as oitos células eletroquímicas.

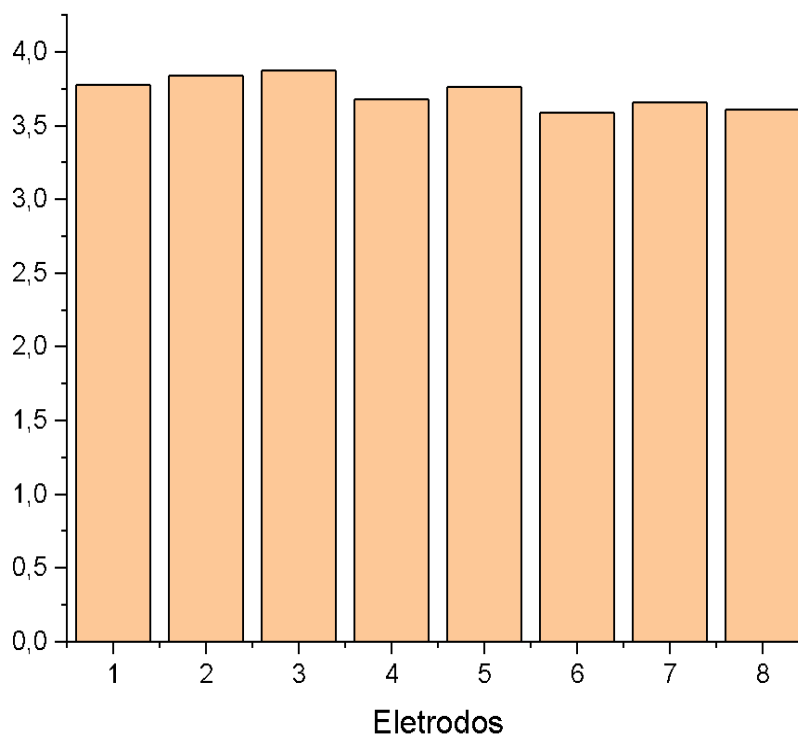


FIGURA 4.2 - Estudo de repetibilidade intradispositivo com uma solução padrão de ácido ferroceno monocarboxílico $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ preparada em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$.

Para o estudo de repetibilidade intradia, foram utilizados três dispositivos diferentes para análise no mesmo dia (FIGURA 4.3), os resultados obtidos podem ser observados nos gráficos de barra, O RSD obtidos para intradias (mesmo dia, dispositivos diferentes foi 2,76 %,

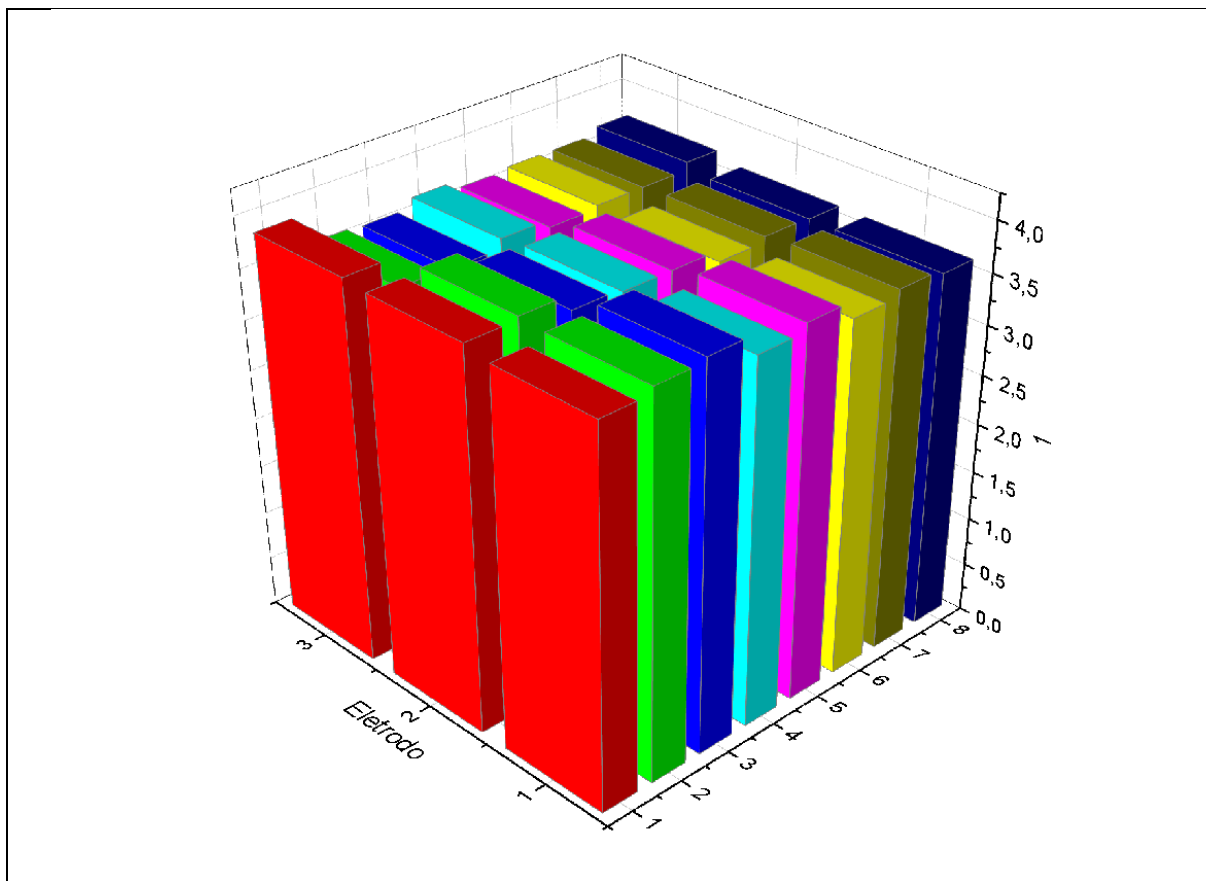


FIGURA 4.3 - Estudo de repetibilidade intradia com uma solução padrão de ácido ferroceno monocarboxílico $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ preparada em $\text{KCl } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$.

Para o estudo de repetibilidade análise interdias (dias diferentes), foram utilizados três dispositivos diferentes para análise em três dias diferentes (FIGURA 4.4), os resultados obtidos podem ser observados nos gráficos de barra, O RSD obtidos para intradias foi 2,59 %,

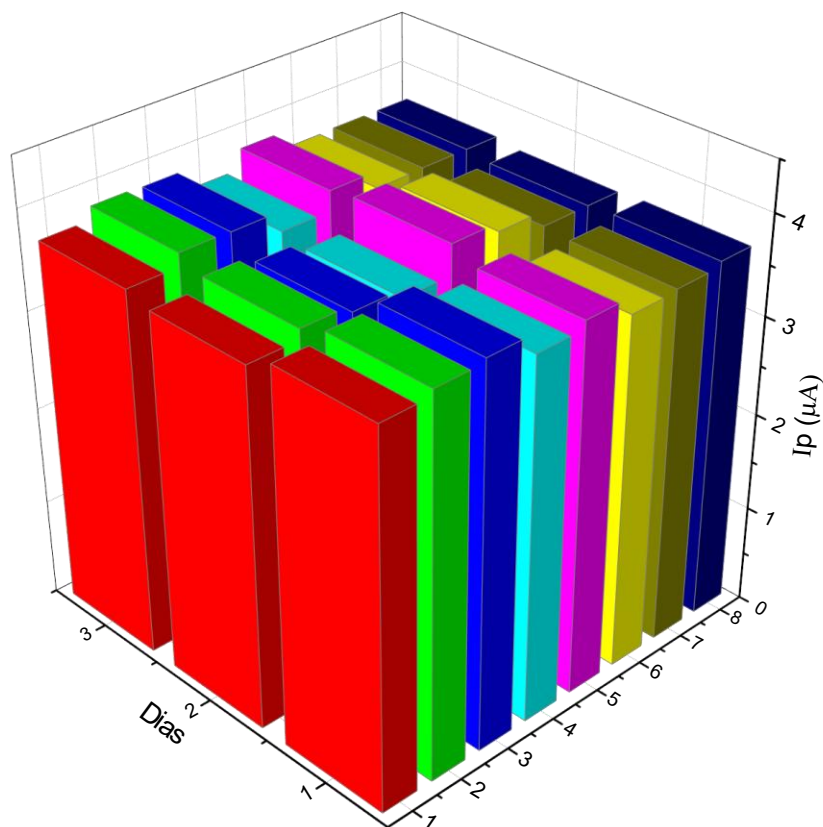


FIGURA 4.4 - Estudo de repetibilidade interdias com uma solução padrão de ácido ferroceno monocarboxílico $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ preparada em $\text{KCl } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$.

Esses resultados em conjunto mostram que as SPCE apresentam um repetitividade e precisão, portanto, podem ser utilizadas para a realização das medidas eletroquímicas na construção do Magneto-imunoensaio.

4.3. Estudos eletroquímicos preliminares com as AuNPs sintéticos

A fim de avaliar o comportamento eletroquímico das AuNPs sintetizados, item 3.5, foram realizadas medidas com SPCE utilizando a técnica de DPV (do inglês, *Differential Pulse Voltammetry*) na ausência e na presença das AuNPs, utilizando $\text{HCl } 0,2 \text{ mol L}^{-1}$ como eletrólito de suporte, a FIGURA 4.5 apresenta as curvas DPV obtidas.

Inicialmente, foi realizado a aplicação do potencial de $+1,25 \text{ V}$ durante 120 segundos resultando na oxidação do Au presente nas AuNPs para Au(III) que na presença dos íons Cl^- forma o íon complexo $[\text{AuCl}_4]^-$, imediatamente após a oxidação eletroquímica, foi realizada uma varredura de potencial de $+1,10$ a $-0,15 \text{ V}$, vs. Ag/AgCl originando um pico catódico. A medida de DPV realizada na presença

das AuNPs resultou no surgimento de um pico em aproximadamente 0,32 V oriundo do processo de redução do ouro presente nas AuNPs.

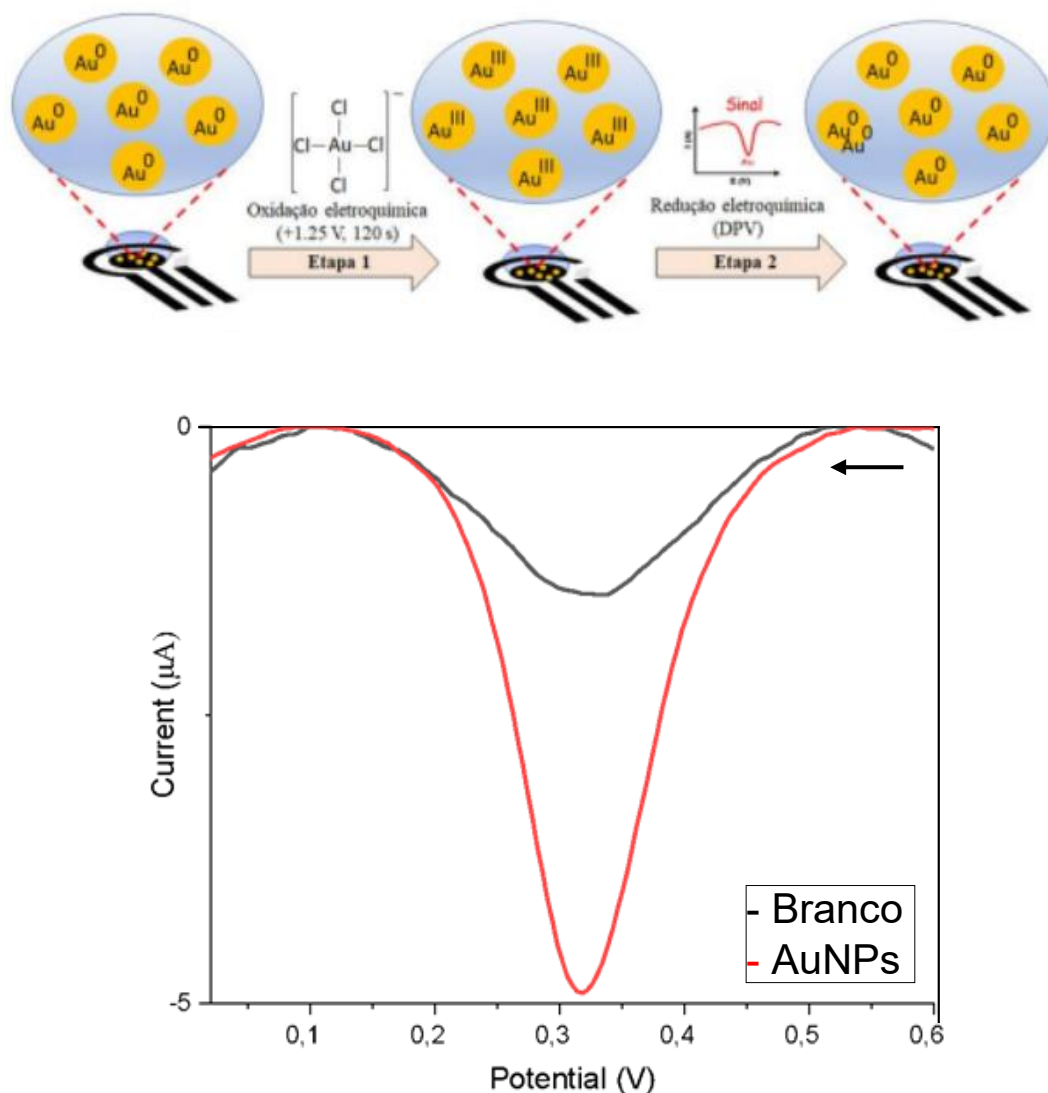


FIGURA 4.5- Representação do processo de oxirredução das AuNPs e as curvas DPV obtidas a partir da aplicação do bioconjugado

4.4. Detecção eletroquímica da quitina

A detecção eletroquímica da quitina, utilizando AuNPs, foi realizada em diferentes pH e soluções como: PBS pH 7,4, Tris-HCl pH 7 e McIlvaine pH 3, 4 e 5 com e sem quitina. As medidas foram realizadas utilizando a técnica de DPV (Voltametria de Pulso Diferencial), com o uso de HCl 0,2 mol L⁻¹ como eletrólito de suporte.

Na Figura 4.6, são apresentadas as respostas voltamétricas obtidas, evidenciando a influência do pH sobre o sinal de redução do ouro, o qual se mostrou dependente das condições do meio.

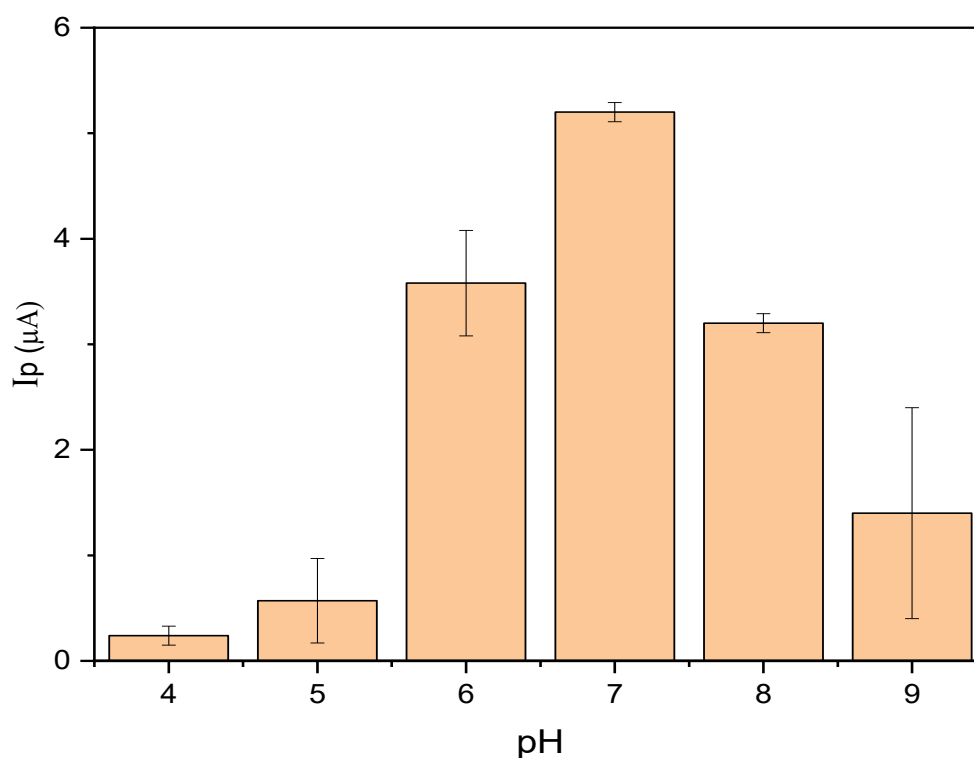


FIGURA 4.6- Resposta do magneto-imunoensaio de duas soluções de quitina em pH de 4 a 9.

Nos experimentos realizados em pH básico (8 e 9), observou-se uma queda considerável na intensidade de corrente. Esse resultado pode ser explicado pelo fato de que, nessas condições, os íons de ouro(III) tendem a se reorganizar formando complexos hidroxilados, como $[\text{Au}(\text{OH})_4]^-$. Quando isso acontece, o processo de redução do ouro se torna menos favorável, já que esses complexos exigem potenciais mais altos para serem reduzidos. Em outras palavras, o ouro passa a “resistir” mais à redução, o que naturalmente se reflete na diminuição do sinal voltamétrico. Além disso, em meio fortemente alcalino, pode ocorrer a dissolução parcial da superfície das nanopartículas de ouro, processo conhecido como etching (ou corrosão química), no qual as partículas sofrem desgaste e têm sua área ativa reduzida. A soma desses fatores ajuda a compreender, em pH ácido, o sinal é mais intenso, enquanto em pH básico ele tende a enfraquecer ou até desaparecer.

Em contrapartida, as condições ácidas favorecem tanto a estabilidade eletroquímica do ouro quanto a interação com a quitina. Isso ocorre porque, em baixos valores de pH, os grupos funcionais da quitina, como as aminas presentes em unidades de glucosamina, encontram-se protonados. Essa protonação aumenta

a afinidade eletrostática entre a quitina e a superfície das nanopartículas de ouro, potencializando a resposta do eletrodo modificado. Assim, a combinação entre maior disponibilidade de sítios ativos no ouro e maior interação da quitina com a superfície contribui para explicar os melhores resultados observados em meio ácido.

Os picos de correntes observados para a amostra sem quitina (branco analítico) apresentam a interação específica a quitina. Além disso, foi observada uma corrente de pico mais intensa na presença da quitina; isto aponta claramente para a interação entre a quitina e o anticorpo anti-quitina-oligômeros (mAb).

4.5. Otimização Magneto-imunoensaio

No intuito de avaliar as melhores condições experimentais foi realizado o planejamento fatorial PCC e Estudo de variação de bloqueio, a fim de melhor diferenciar as respostas de branco de uma amostra com quitina.

4.5.1. Planejamento fatorial PCC

O planejamento fatorial PCC foi organizado como um planejamento fatorial 2^6 com ponto central, sendo realizados experimentos de 1 a 64 com as variáveis codificadas entre -1 e $+1$, de forma que do experimento 65 ao 67 são réplicas realizadas no ponto central e os experimentos de 68 a 79 representam os pontos axiais (variáveis codificadas nos níveis $-\alpha$ e $+\alpha$). A variável independente foi as respostas entre o branco e a amostra ($-\Delta I$). As variáveis dependentes em seus respectivos níveis de variação e as respostas obtidas estão descritos na TABELA 4.1.

TABELA 4.1 - Resultados experimentais do planejamento para as variáveis: a concentração de PMs a serem modificadas (C_{PMs} , variável 1), a concentração de anticorpo a ser imobilizada na superfície das PMs ($C_{Anticorpo-PMs}$, variável 2), Concentração de AuNPs a serem modificadas (C_{AuNPs} , variável 3), a concentração de anticorpo a ser imobilizada na superfície das AuNPs ($C_{Anticorpo-AuNPs}$, variável 4), o tempo de incubação entre o bioconjugado PMs-mAb com Ch (Tempo da 1ª incubação, variável 5), o tempo de incubação entre o bioconjugado PMs-mAb/Ch com AuNPs-mAb, formando o bioconjugado final. (Tempo da 2ª incubação, variável 6) entre o branco a amostra ($-\Delta I$).

Exp.	V1	V2	V3	V4	V5	V6	$-\Delta I$
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	453,42
2	-1	-1	-1	-1	-1	1	450,01
3	-1	-1	-1	-1	1	-1	655,06
4	-1	-1	-1	-1	1	1	484,14
5	-1	-1	-1	1	-1	-1	368,48
6	-1	-1	-1	1	-1	1	370,52
7	-1	-1	-1	1	1	-1	450,97
8	-1	-1	-1	1	1	1	420,33
9	-1	-1	1	-1	-1	-1	561,83

10	-1	-1	1	-1	-1	1	402,26
11	-1	-1	1	-1	1	-1	640,73
12	-1	-1	1	-1	1	1	557,73
13	-1	-1	1	1	-1	-1	466,46
14	-1	-1	1	1	-1	1	306,98
15	-1	-1	1	1	1	-1	545,72
16	-1	-1	1	1	1	1	441,43
17	-1	1	-1	-1	-1	-1	601,28
18	-1	1	-1	-1	-1	1	520
19	-1	1	-1	-1	1	-1	707,71
20	-1	1	-1	-1	1	1	580,17
21	-1	1	-1	1	-1	-1	428,34
22	-1	1	-1	1	-1	1	375,68
23	-1	1	-1	1	1	-1	517,31
24	-1	1	-1	1	1	1	490,89
25	-1	1	1	-1	-1	-1	494,42
26	-1	1	1	-1	-1	1	436,67
27	-1	1	1	-1	1	-1	725,41
28	-1	1	1	-1	1	1	534,24
29	-1	1	1	1	-1	-1	417,14
30	-1	1	1	1	-1	1	309,84
31	-1	1	1	1	1	-1	563,81
32	-1	1	1	1	1	1	364,96
33	1	-1	-1	-1	-1	-1	458,57
34	1	-1	-1	-1	-1	1	417,7
35	1	-1	-1	-1	1	-1	709,5
36	1	-1	-1	-1	1	1	564,07
37	1	-1	-1	1	-1	-1	420,58
38	1	-1	-1	1	-1	1	365,4
39	1	-1	-1	1	1	-1	538,84
40	1	-1	-1	1	1	1	477,28
41	1	-1	1	-1	-1	-1	537,89
42	1	-1	1	-1	-1	1	423,15
43	1	-1	1	-1	1	-1	704,19
44	1	-1	1	-1	1	1	635,28
45	1	-1	1	1	-1	-1	476,54
46	1	-1	1	1	-1	1	382,99
47	1	-1	1	1	1	-1	703,57
48	1	-1	1	1	1	1	525,6
49	1	1	-1	-1	-1	-1	586,38
50	1	1	-1	-1	-1	1	552,46
51	1	1	-1	-1	1	-1	653,14
52	1	1	-1	-1	1	1	557,95
53	1	1	-1	1	-1	-1	496,18
54	1	1	-1	1	-1	1	321,46
55	1	1	-1	1	1	-1	583,64
56	1	1	-1	1	1	1	517,5

57	1	1	1	-1	-1	-1	626,64
58	1	1	1	-1	-1	1	578,09
59	1	1	1	-1	1	-1	800
60	1	1	1	-1	1	1	679,57
61	1	1	1	1	-1	-1	446,49
62	1	1	1	1	-1	1	423,99
63	1	1	1	1	1	-1	637,7
64	1	1	1	1	1	1	472,29
65	0	0	0	0	0	0	587,34
66	0	0	0	0	0	0	564,75
67	0	0	0	0	0	0	536,53
68	A	0	0	0	0	0	540,69
69	- α	0	0	0	0	0	387,07
70	0	α	0	0	0	0	538,79
71	0	- α	0	0	0	0	496,37
72	0	0	α	0	0	0	531,37
73	0	0	- α	0	0	0	513,54
74	0	0	0	α	0	0	300
75	0	0	0	- α	0	0	576,31
76	0	0	0	0	α	0	747,58
77	0	0	0	0	- α	0	301,23
78	0	0	0	0	0	α	365,87
79	0	0	0	0	0	- α	601,45

Inicialmente, foi elaborada uma matriz principal com os efeitos. Assim, o modelo foi avaliado empregando a rotina “fabi_efeito” para determinar quais efeitos são mais importantes para obter os melhores resultados. Para isso, foi calculado a variância experimental (460,4728), erro experimental (21,4586) e o erro de um efeito (6,1946) por meio dos resultados obtidos nas réplicas do ponto central. Na FIGURA 4.7 é apresentado o gráfico de porcentagem que cada efeito impacta na resposta enquanto na FIGURA 4.8 são apresentados os efeitos significativos em um intervalo de confiança de 95% e $t = 4,303$ para grau de liberdade igual a 2 uma vez que havia 3 réplicas no ponto central.

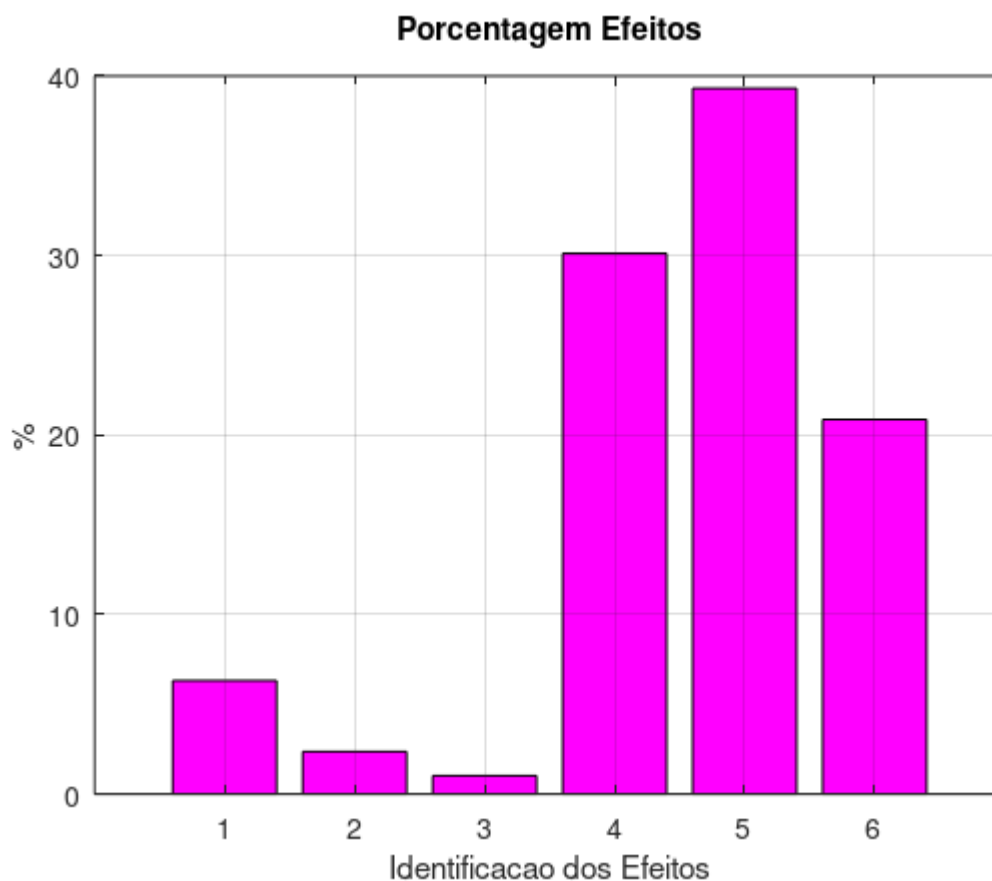


FIGURA 4.7 - Significância dos efeitos referentes as variáveis a concentração de PMs a serem modificadas (CPMs, variável 1), a concentração de anticorpo a ser imobilizada na superfície das PMs (CAnticorpo-PMs, variável 2), Concentração de AuNPs a serem modificadas (CAuNPs, variável 3), a concentração de anticorpo a ser imobilizada na superfície das AuNPs (CAnticorpo-AuNPs, variável 4), o tempo de incubação entre o bioconjugado PMs-mAb com Ch (Tempo da 1° incubação, variável 5), o tempo de incubação entre o bioconjugado PMs-mAb/Ch com AuNPs-mAb, formando o bioconjugado final. (Tempo da 2° incubação, variável 6).

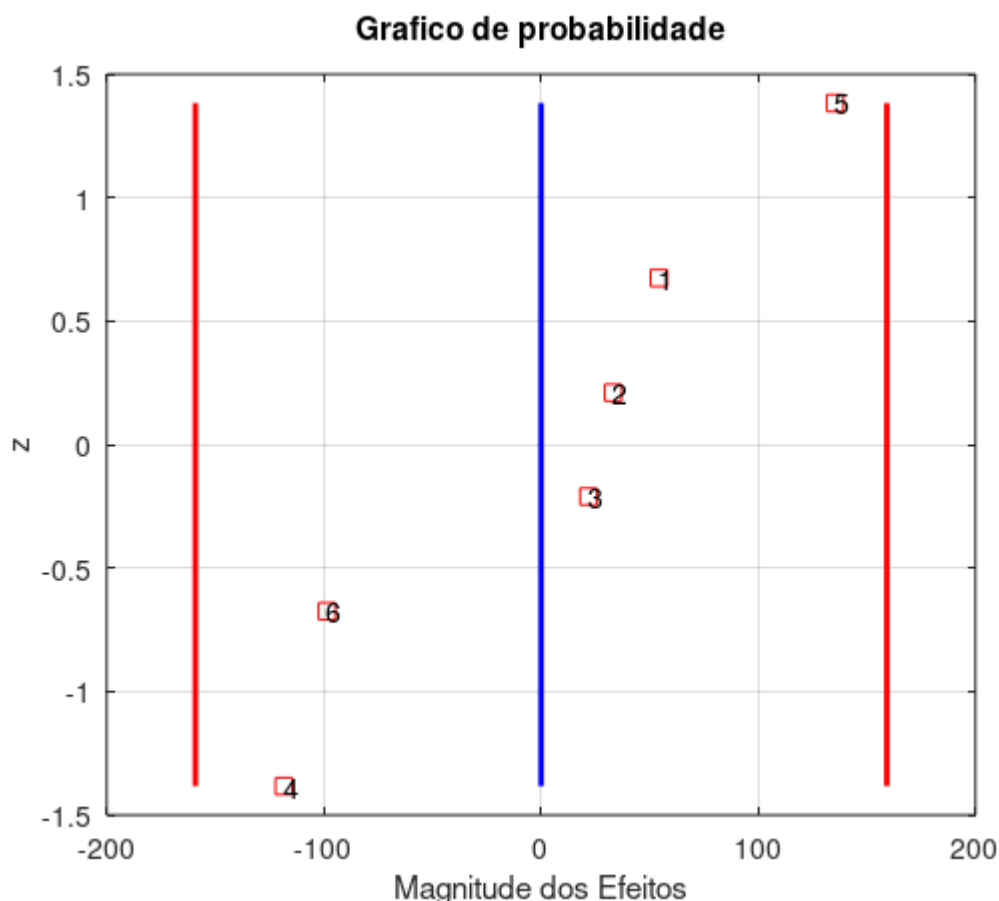


FIGURA 4.8 - Gráfico de probabilidade dos efeitos pela magnitude dos efeitos referentes as variáveis a concentração de PMs a serem modificadas (CPMs, variável 1), a concentração de anticorpo a ser imobilizada na superfície das PMs (CAnticorpo-PMs, variável 2), Concentração de AuNPs a serem modificadas (CAuNPs, variável 3), a concentração de anticorpo a ser imobilizada na superfície das AuNPs (CAnticorpo-AuNPs, variável 4), o tempo de incubação entre o bioconjugado PMs-mAb com Ch (Tempo da 1^o incubação, variável 5), o tempo de incubação entre o bioconjugado PMs-mAb/Ch com AuNPs-mAb, formando o bioconjugado final. (Tempo da 2^o incubação, variável 6).

Como podemos observar na FIGURA 4.7, os efeitos 4,5 e 6 foram que apresentaram maior porcentagem e influência na resposta. Uma nova matriz apenas contendo somente os efeitos significativos, foi avaliada por meio da mesma rotina anterior. Os valores de variância experimental (537,2664), erro experimental (23,179), erro de um efeito (0,0089) e valor de $t = 2,003$ (grau de liberdade igual a 8) foram recalculados por meio das novas réplicas contidas na matriz e os novos gráficos foram obtidos.

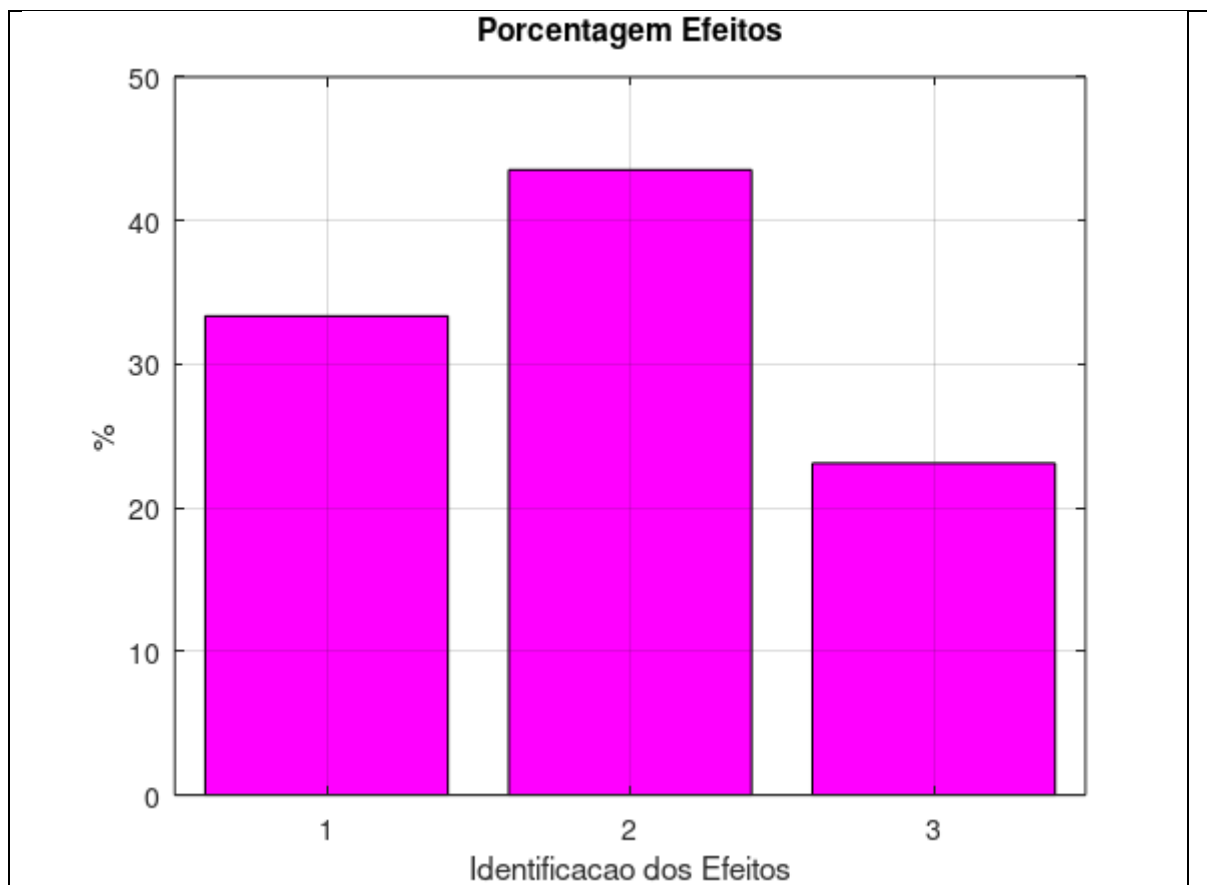


FIGURA 4.9 - Significância dos efeitos referentes as variáveis a concentração de anticorpo a ser imobilizada na superfície das AuNPs (CAnticorpo-AuNPs, variável 4), o tempo de incubação entre o bioconjugado PMs-mAb com Ch (Tempo da 1° incubação, variável 5), o tempo de incubação entre o bioconjugado PMs-mAb/Ch com AuNPs-mAb, formando o bioconjugado final. (Tempo da 2° incubação, variável 6).

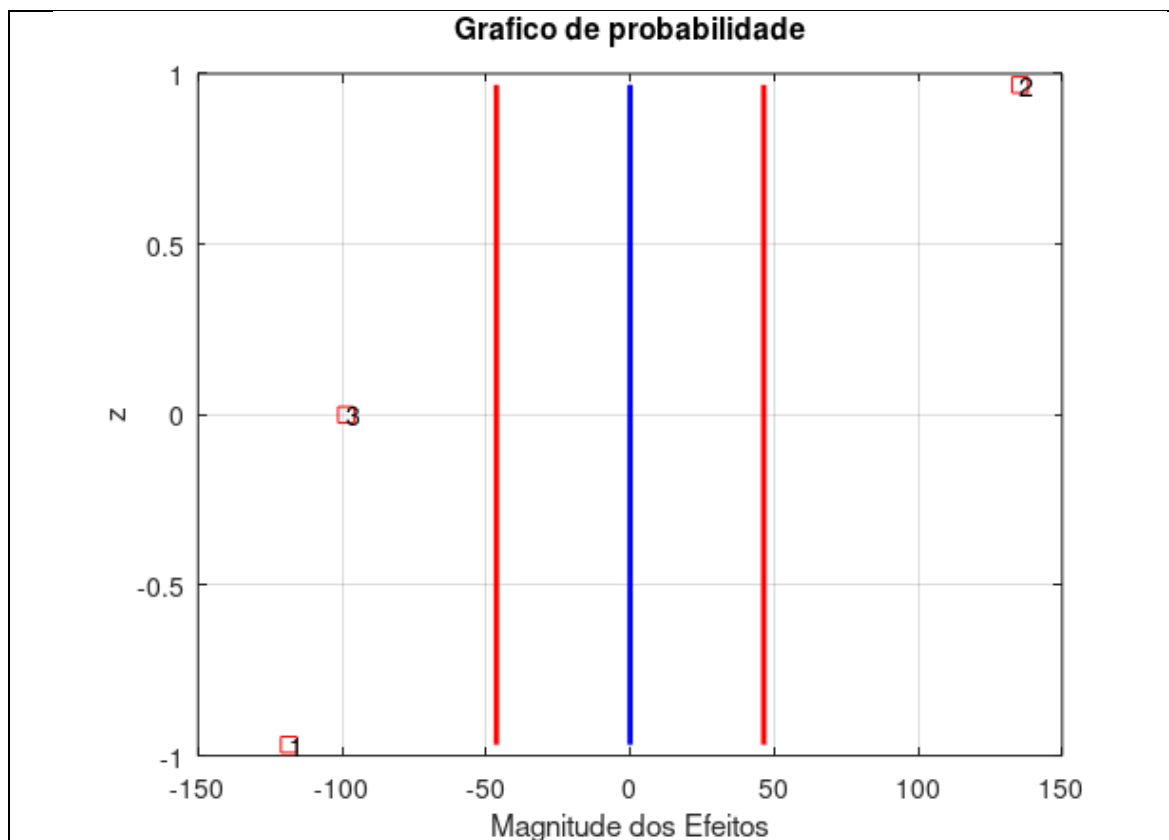


FIGURA 4.10 - Gráfico de probabilidade dos efeitos pela magnitude dos efeitos das variáveis a concentração de anticorpo a ser imobilizada na superfície das AuNPs (CAnticorpo-AuNPs, variável 4), o tempo de incubação entre o bioconjugado PMS-mAb com Ch (Tempo da 1^o incubação, variável 5), o tempo de incubação entre o bioconjugado PMS-mAb/Ch com AuNPs-mAb, formando o bioconjugado final. (Tempo da 2^o incubação, variável 6).

Com os valores dos coeficientes significativos do planejamento fatorial atual, foi possível determinar a equação que representa o modelo e gerar os gráficos de contorno a cada duas variáveis conforme apresentado na FIGURA 4.11. e FIGURA 4.12.

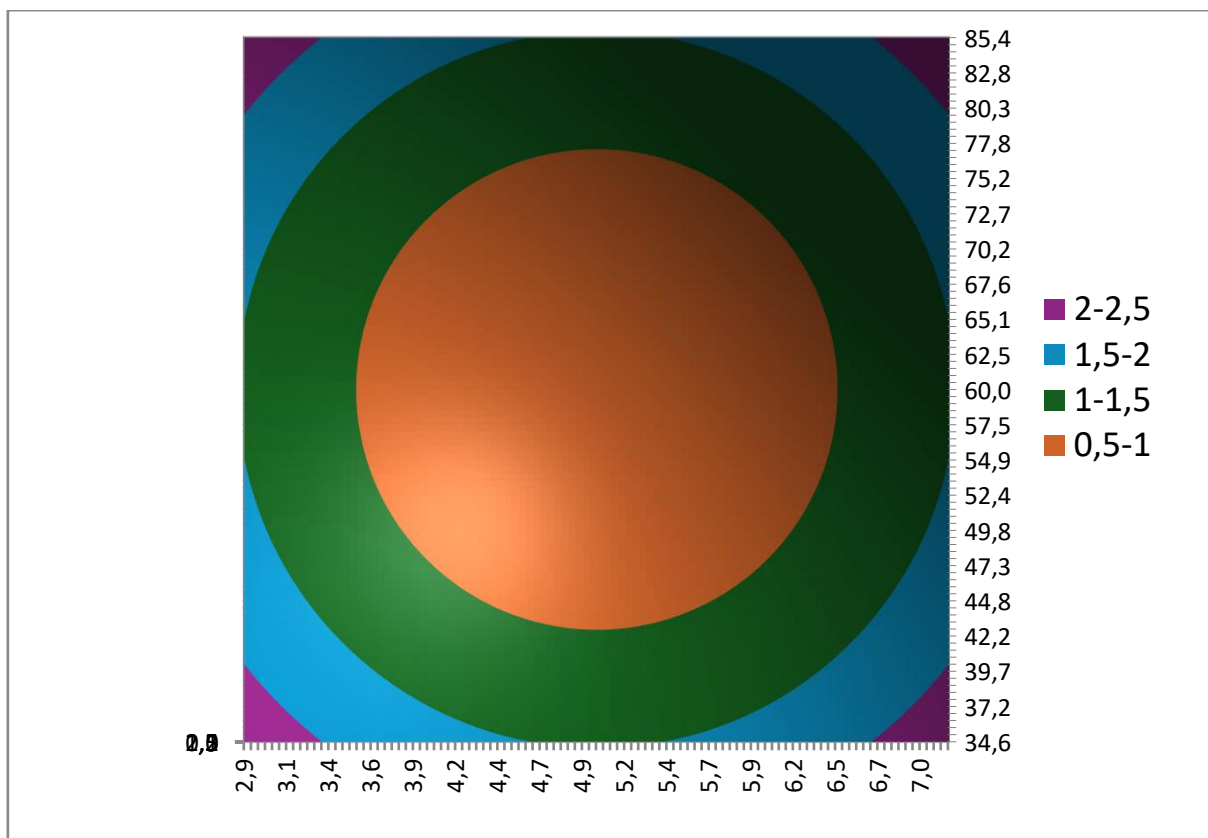


FIGURA 4.11 - Gráficos de contorno referentes ao planejamento fatorial 2^3 relacionando as variáveis 4,5 e 6.

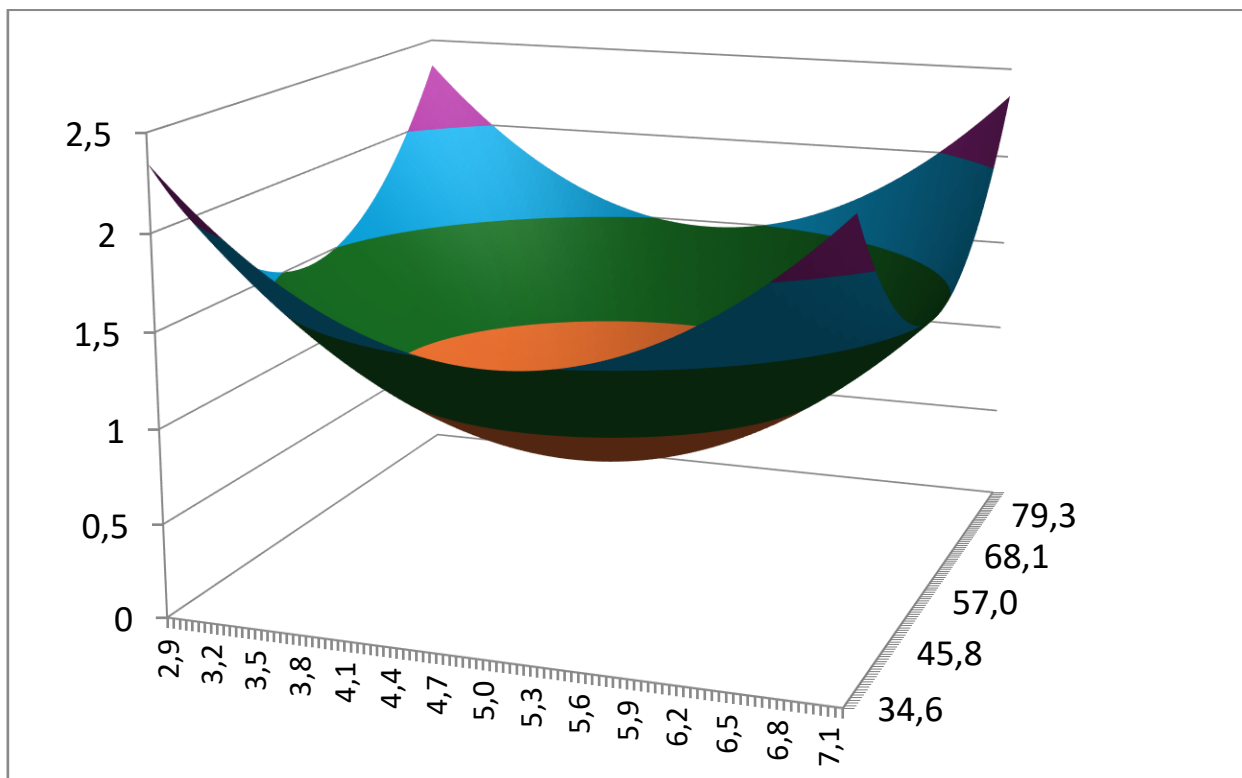


FIGURA 4.12 - Gráficos de superfície referentes ao planejamento fatorial 2^3 relacionando as variáveis 4,5 e 6.

Por fim, no gráfico de contorno é apresentado diferentes regiões, que indicam as condições experimentais possíveis relacionadas a duas variáveis. Como pode ser observado na FIGURA 4.11, as regiões que proporcionam maior resultado são as de coloração roxa, sendo as condições escolhidas para os demais estudos. Portanto, a concentração de anticorpo a ser imobilizada na superfície das AuNPs ($C_{\text{Anticorpo-AuNPs}}$, variável 4) foi $7,12 \mu\text{g mL}^{-1}$, o tempo de incubação entre o bioconjugado PMs-mAb com Ch (Tempo da 1° incubação, variável 5) escolhido foi de 17,31 mim, o tempo de incubação entre o bioconjugado PMs-mAb/Ch com AuNPs-mAb, formando o bioconjugado final. (Tempo da 2° incubação, variável 6) foi 34,62 minutos, dessa forma foi possível determinar as melhores condições de trabalho.

4.5.2. Estudo da etapa de bloqueio

Para minimizar interações inespecíficas, foram realizados testes de bloqueio nas nanopartículas de ouro e magnéticas utilizando diferentes agentes bloqueadores: albumina sérica bovina (BSA), etanolamina (ETA) e a sua combinação BSA+ETA. Os resultados mostraram que o bloqueio mais eficaz para as AuNPs foi obtido com BSA+ETA, enquanto para as MPs o melhor desempenho foi alcançado com ETA isoladamente. Embora testes individuais tenham mostrado desempenho variável para ETA nas PMs, a combinação BSA+ETA apresentou menor erro experimental e maior consistência nos resultados. Por esse motivo, optou-se por utilizar a combinação BSA+ETA para o bloqueio tanto das AuNPs quanto das PMs (Figuras 4.13).

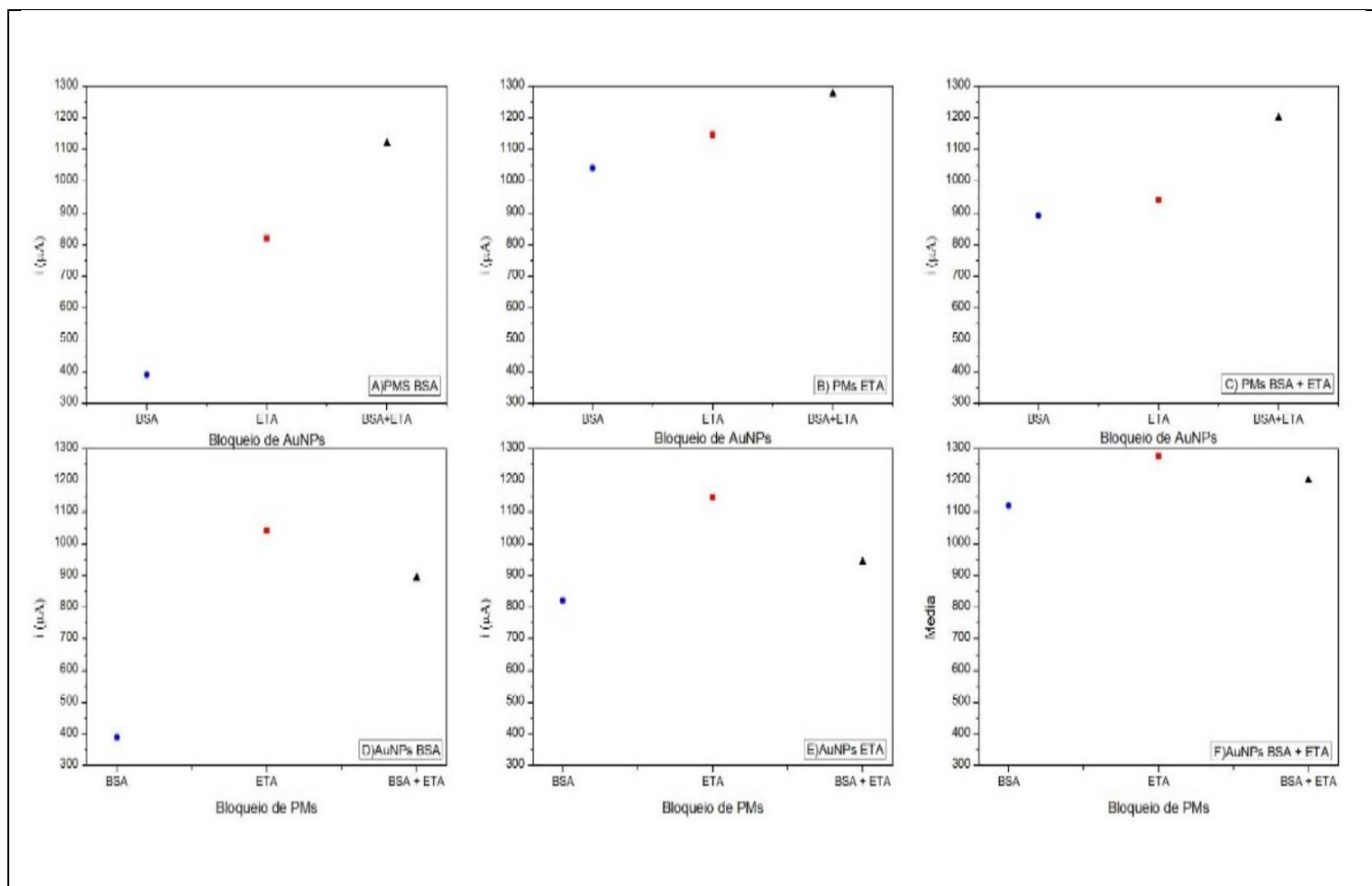


FIGURA 4.13- Resultados de pico de redução de Au(III) de acordo com bloqueio de BSA, ETA e BSA+ETA em nanopartículas magnéticas(PMs) e nanopartículas de ouro (AuNPs). A) Bloqueio de AuNPs em BSA, ETA e BSA+ETA em reação com PMS bloqueado com BSA para formação do bioconjugado; B) Bloqueio de AuNPs em BSA, ETA e BSA+ETA em reação com PMS bloqueado com ETA para formação do bioconjugado; C) Bloqueio de AuNPs em BSA, ETA e BSA+ETA em reação com PMS bloqueado com BSA+ETA para formação do bioconjugado; D) Bloqueio de PMs em BSA, ETA e BSA+ETA em reação com AuNPs bloqueado com BSA para formação do bioconjugado; E) Bloqueio de PMs em BSA, ETA e BSA+ETA em reação com AuNPs bloqueado com ETA para formação do bioconjugado; F) Bloqueio de PMs em BSA, ETA e BSA+ETA em reação com AuNPs bloqueado com BSA+ETA para formação do bioconjugado.

A BSA, por ser uma proteína relativamente grande, se fixa à superfície das AuNPs, formando uma camada que cobre os espaços disponíveis e fornece proteção estérica, ou seja, cria uma barreira física que dificulta a ligação de outras moléculas ou partículas indesejadas. A ETA, por sua vez, é uma molécula menor que complementa esse bloqueio, preenchendo os pequenos espaços ou grupos reativos que ainda permanecem expostos após a adsorção da BSA, ajudando a impedir ligações não específicas.

Nos testes iniciais, a combinação BSA+ETA apresentou o bloqueio mais consistente nas AuNPs, garantindo proteção estérica e neutralização de sítios reativos. Para as PMs, embora o uso de ETA isoladamente tenha mostrado algum efeito de bloqueio, os resultados apresentaram maior variação e erro experimental.

Por outro lado, a aplicação da combinação BSA+ETA em ambas as partículas reduziu significativamente o erro dos experimentos, fornecendo resultados mais confiáveis. Dessa forma, optou-se por adotar o protocolo de bloqueio com BSA seguida de ETA tanto para AuNPs quanto para PMs, assegurando que o sinal do magneto-imunoensaio pudesse ser claramente distinguido do branco, sem interferências (Figuras 4.14).

Essa abordagem mostra a importância de um bloqueio eficiente: sem ele, moléculas ou partículas indesejadas poderiam se ligar às superfícies, comprometendo a sensibilidade e a precisão do ensaio. Ao combinar uma proteína grande com um bloqueador pequeno, é possível criar uma camada de proteção completa, equilibrando barreira física e química, o que é essencial para experimentos de detecção sensível como os que envolvem imunoenaios magnéticos.

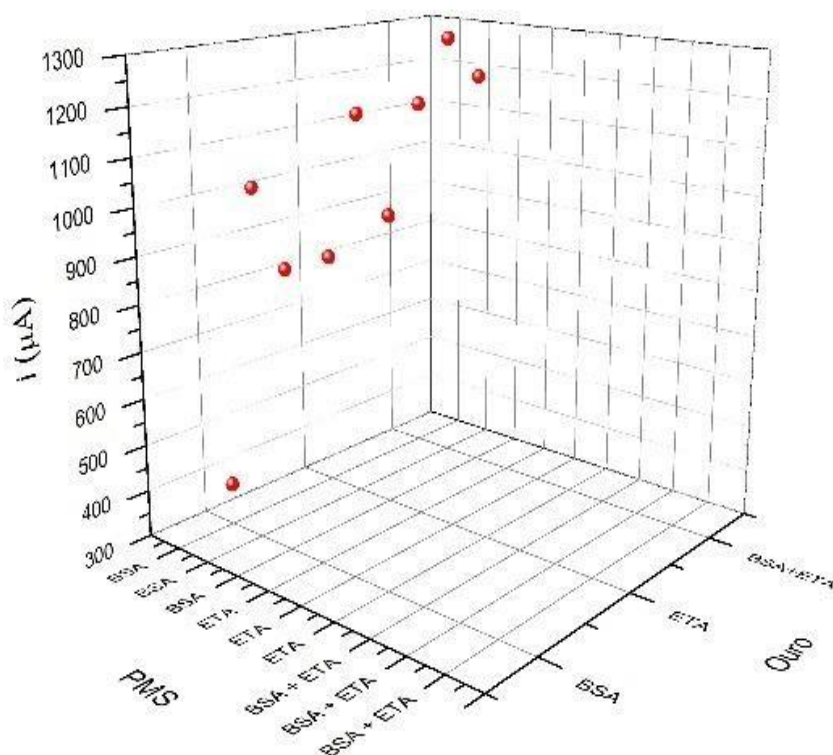


FIGURA 4.14 - Resultados do pico de redução do ouro em diferentes bloqueios (BSA, ETA, BSA+ETA) nas nanopartículas de ouro e nanopartículas magnéticas (PMS).

4.6. Construção da curva calibração

Após a otimização dos parâmetros, o magneto-imunoensaio proposto foi aplicado em soluções padrão contendo concentrações variadas quitina, foi realizada uma curva de calibração utilizando concentrações entre 0,03 e 2,2 mg

mL⁻¹. Os valores de corrente obtidos por DPV estão apresentados na Figura 4.15, mostrando uma relação linear.

As correntes transientes aumentaram linearmente com o logaritmo da concentração de quitina. A equação de regressão linear foi $y = 652,8 + 179,28x$, com um r de 0,983, indicando uma relação linear entre a resposta e a concentração de quitina.

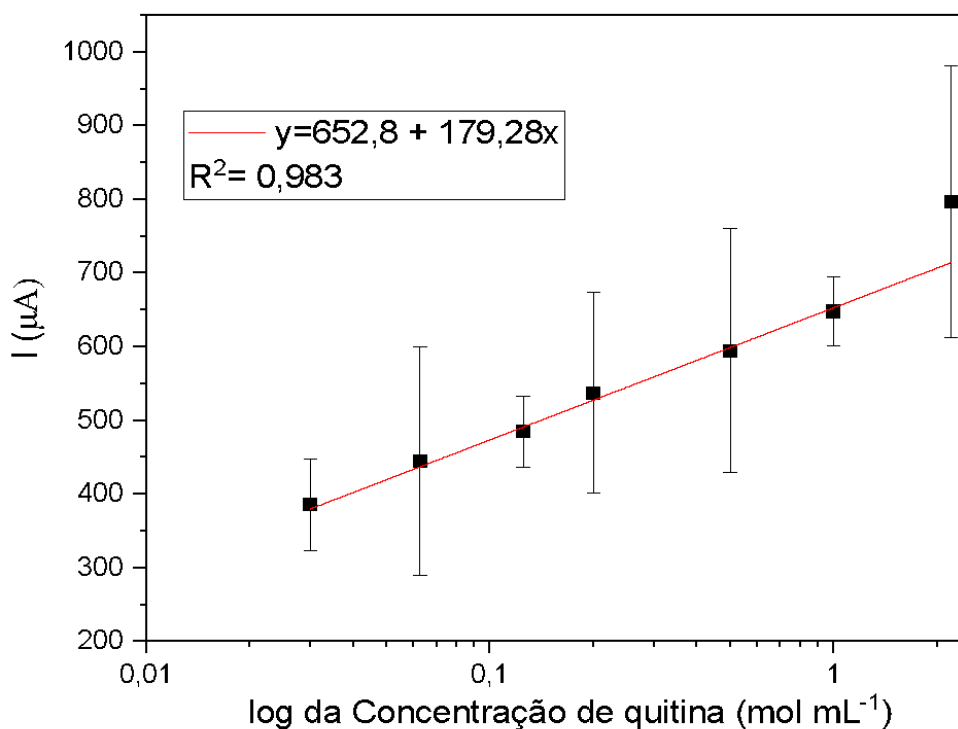


FIGURA 4.15 - Valores do pico anódico em variação de concentração de quitina.

A curva de calibração demonstra a sensibilidade e o potencial do método para quantificação precisa de quitina em amostras biológicas, atendendo aos requisitos para aplicações diagnósticas.

4.7. Efeito do magneto-imunoensaio em leveduras de fungos

A fim de verificar como o modelo reage à leveduras foi testado a metodologia com leveduras do tipo das *Saccharomyces*, além disso foi utilizado três tipos diferentes de leveduras, doados pelo professor Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha, na figura 4.16 mostram variações na resposta eletroquímica devido às diferenças na concentração de quitina nas paredes celulares das leveduras.

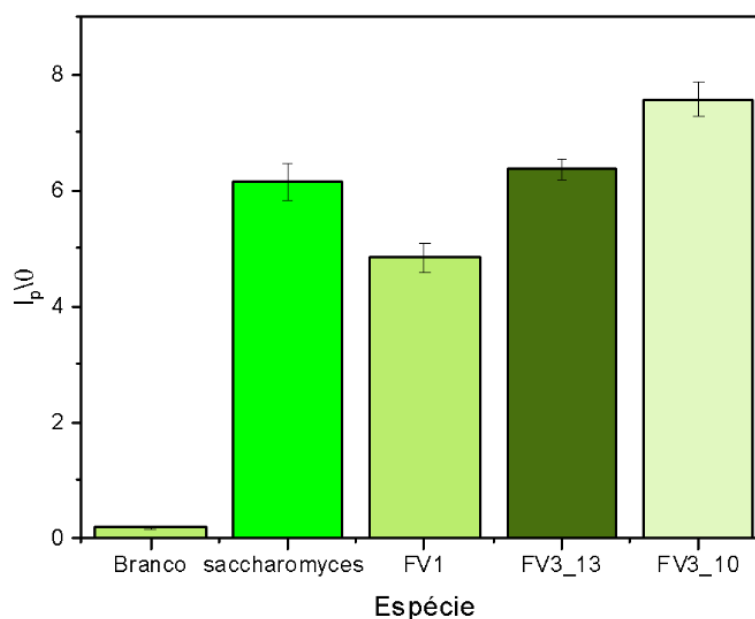


FIGURA 4.16 - Valores de corrente de pico para a redução do Au(III) para diferentes grupos de leveduras em diferentes concentrações Saccharomyces $4 \cdot 10^4$ cell mL⁻¹; FV1 $5 \cdot 10^7$ cell mL⁻¹; FV3_13 $1 \cdot 10^8$ cell mL⁻¹; FV3_10 $7 \cdot 10^7$ cell mL⁻¹.

Na FIGURA 4.16, observa-se que a intensidade dos picos varia de acordo com a concentração e a espécie fúngica. Essa diferença pode ser atribuída tanto às distintas quantidades de quitina presentes na parede celular quanto às variações no tamanho das células, características que influenciam diretamente a resposta observada.

Além da variação observada entre espécies e concentrações (FIGURA 4.16), buscou-se avaliar também a influência da lise celular na resposta eletroquímica obtida. Esse aspecto é particularmente relevante, uma vez que o rompimento das células pode expor ou liberar quantidades diferentes de quitina e outros componentes da parede celular, impactando diretamente a intensidade do sinal. Para verificar esse efeito, foram analisadas duas amostras: uma contendo células de levedura intactas e outra composta pelo lisado da mesma espécie, preparadas em concentrações semelhantes para possibilitar a comparação.

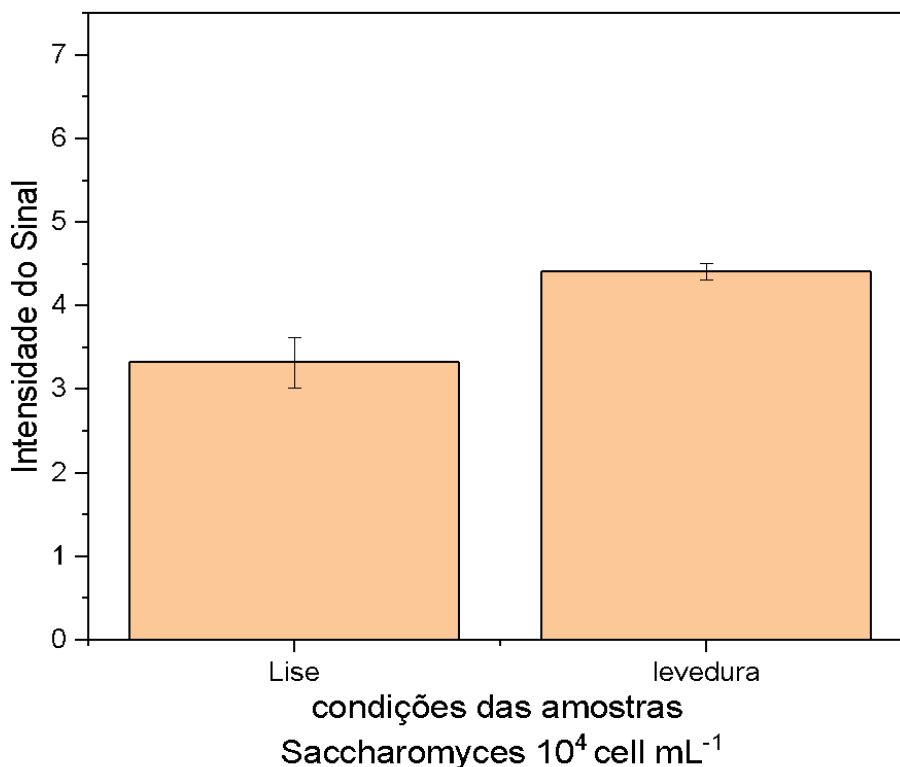


FIGURA 4.17 - Comparação da resposta eletroquímica entre células de levedura intactas e lisado celular da mesma espécie, em concentrações semelhantes.

Na FIGURA 4.17 observa-se que a amostra de lisado de levedura apresentou intensidade de sinal eletroquímico inferior em comparação à amostra de levedura intacta, ambas preparadas em concentrações semelhantes. Essa redução pode estar associada ao rompimento da parede celular durante o processo de lise, que pode ter causado a dispersão ou degradação parcial dos componentes estruturais, diminuindo a quantidade de quitina disponível para interação com o sistema de detecção. Outra possibilidade é que o processo de lise tenha liberado moléculas interferentes, que competem ou dificultam o reconhecimento específico dos biorreceptores, resultando em menor intensidade de resposta.

4.8. Construção da curva calibração com leveduras

Após a otimização dos parâmetros, o magneto-imunoensaio proposto foi aplicado em soluções padrão contendo concentrações variadas de leveduras do tipo *Saccharomyces*, foi realizada uma curva de calibração utilizando concentrações entre 10² a 10⁶ cell mL⁻¹. Os valores de corrente obtidos por DPV estão apresentados na Figura 4.18, mostrando uma relação linear.

As correntes transientes aumentaram linearmente da concentração de leveduras. A equação de regressão linear foi $y = 0,36411 + 2,979x$, com um r de 0,9616, indicando uma excelente relação linear entre a resposta e a concentração de quitina.

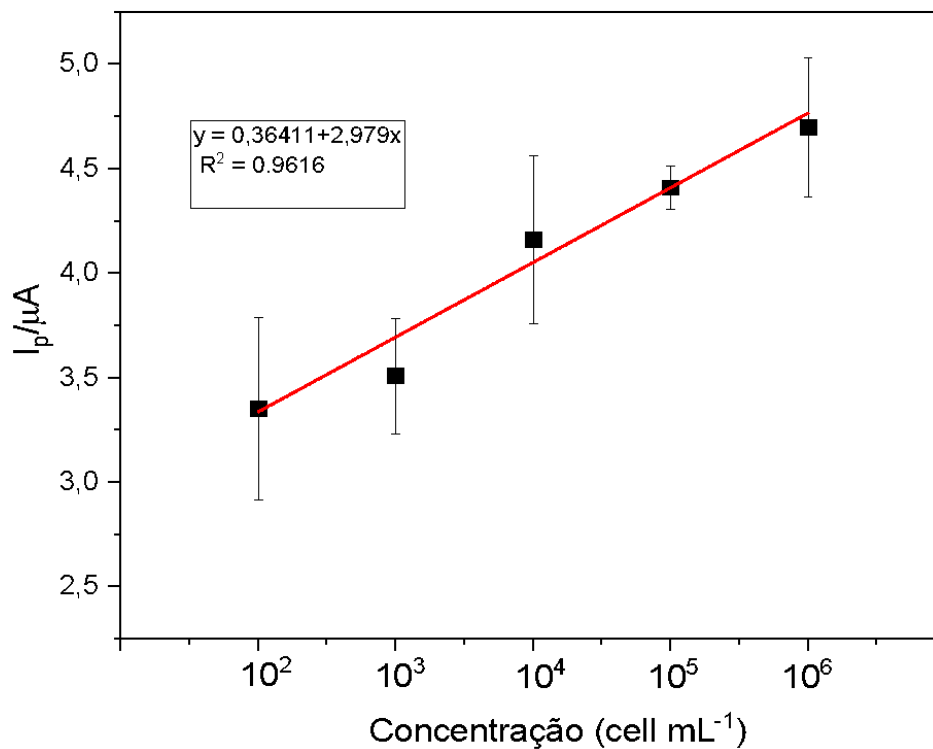


FIGURA 4.18 - Valores do pico anóptico em variação de concentração de levedura do tipo *Saccharomyces*.

CAPÍTULO 5

Conclusões

5. CONCLUSÕES

Neste trabalho foi desenvolvido um método simples e com baixo custo para o diagnóstico rápido e precoce de infecções fúngicas invasivas, usando duas etapas a primeira a etapa de captura da quitina presente na parede celular dos fungos utilizando o conjugado PMs-Ab e a etapa de detecção com o conjugado Ab-AuNPs, construindo assim no final do processo o bioconjugado. Para validar a eficácia do método, foram realizadas diversas otimizações e caracterizações.

As otimizações univariadas realizadas foram importantes para encontrar as condições mais eficientes do imunoensaio e assim obter a melhor resposta eletroquímica com maior diferenciação entre o branco e uma amostra referência.

O planejamento fatorial realizado, permitiu encontrar as melhores condições para a concentração de peptídeo sintético e das partículas magnéticas, ambos utilizados na etapa de modificação das PMs com quitina, além dos tempos de incubação necessários para a formação do bioconjugado final. A avaliação da precisão intermediária e repetibilidade apresentaram valores de DPR menores de 15%, o que é aceitável para imunoenaios. Portanto, pode-se considerar que o planejamento foi bem-sucedido, sendo possível encontrar as melhores condições para as variáveis estudadas.

Durante as etapas de otimização, o método apresentou valores excelentes de intensidade de corrente em parâmetros críticos como tempo de incubação e volumes de conjugados utilizados nas etapas de captura e detecção. Essas otimizações possibilitam este método ser utilizado em amostras de sangue total de indivíduos saudáveis e indivíduos infectados.

6. REFERENCIAS

- (1) Hawksworth, D. L.; Lücking, R. Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species. *Microbiol Spectr* **2017**, *5* (4). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0052-2016>.
- (2) Money, N. P. *Fungi: A Very Short Introduction*; Oxford University Press, 2016.
- (3) Naranjo-Ortiz, M. A.; Gabaldón, T. Fungal Evolution: Major Ecological Adaptations and Evolutionary Transitions. *Biol Rev Camb Philos Soc* **2019**, *94* (4), 1443–1476. <https://doi.org/10.1111/brv.12510>.
- (4) 1996 - Alexopoulos Et Al - *Introductory Mycology, 4th Ed* | PDF | Mycotoxin | Fungus. <https://pt.scribd.com/document/726327719/1996-Alexopoulos-Et-Al-Introductory-Mycology-4th-Ed> (accessed 2025-06-05).
- (5). Webster J. y R. Weber. *Webster J. Y R. Weber, 2007. Introduction To Fungi. Cambridge (1)*.
- (6) Moore, D.; Robson, G. D.; Trinci, A. P. J. *21st Century Guidebook to Fungi*. Higher Education from Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/9781108776387>.
- (7) Latgé, J. P. *Aspergillus Fumigatus and Aspergillosis. Clin Microbiol Rev* **1999**, *12* (2), 310–350. <https://doi.org/10.1128/CMR.12.2.310>.
- (8) Morelli, K. A.; Kerkaert, J. D.; Cramer, R. A. *Aspergillus Fumigatus Biofilms: Toward Understanding How Growth as a Multicellular Network Increases Antifungal Resistance and Disease Progression. PLoS Pathog* **2021**, *17* (8), e1009794. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009794>.
- (9) Juvvadi, P. R.; Lamoth, F.; Steinbach, W. J. *Calcineurin-Mediated Regulation of Hyphal Growth, Septation, and Virulence in Aspergillus Fumigatus. Mycopathologia* **2014**, *178* (5–6), 341–348. <https://doi.org/10.1007/s11046-014-9794-9>.
- (10) Haritash, A. K.; Kaushik, C. P. *Biodegradation Aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A Review. J Hazard Mater* **2009**, *169* (1–3), 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.03.137>.
- (11) (PDF) *Fungi at the Edge of Life: Cryptoendolithic Black Fungi from Antarctic Desert. ResearchGate*.

(12) Maheshwari, R.; Bharadwaj, G.; Bhat, M. K. Thermophilic Fungi: Their Physiology and Enzymes. *Microbiol Mol Biol Rev* **2000**, *64* (3), 461–488. <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.3.461-488.2000>.

(13) Lopes, F. C. Produção e análise de metabólitos secundários de fungos filamentosos. **2011**.

(14) Cantu, D.; Carl Greve, L.; Labavitch, J. M.; Powell, A. L. T. Characterization of the Cell Wall of the Ubiquitous Plant Pathogen *Botrytis Cinerea*. *Mycological Research* **2009**, *113* (12), 1396–1403. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2009.09.006>.

(15) Free, S. J. Fungal Cell Wall Organization and Biosynthesis. *Adv Genet* **2013**, *81*, 33–82. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407677-8.00002-6>.

(16) *The Fungal Cell Wall: Structure, Biosynthesis, and Function* | *Microbiology Spectrum*. <https://journals.asm.org/doi/10.1128/microbiolspec.funk-0035-2016> (accessed 2025-06-05).

(17) Bowman, S. M.; Free, S. J. The Structure and Synthesis of the Fungal Cell Wall. *BioEssays* **2006**, *28* (8), 799–808. <https://doi.org/10.1002/bies.20441>.

(18) (PDF) β -Glucan: Crucial Component of the Fungal Cell Wall and Elusive MAMP in Plants. *ResearchGate*. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.12.004>.

(19) Boswell, G. P.; Jacobs, H.; Gadd, G. M.; Ritz, K.; Davidson, F. A. A Mathematical Approach to Studying Fungal Mycelia. *Mycologist* **2003**, *17* (4), 165–171. [https://doi.org/10.1017/S0269-915X\(04\)00403-3](https://doi.org/10.1017/S0269-915X(04)00403-3).

(20) The Symbionts Forming Arbuscular Mycorrhizas. In *Mycorrhizal Symbiosis (Third Edition)*; Smith, S. E., Read, D., Eds.; Academic Press: London, 2008; pp vii–ix. <https://doi.org/10.1016/B978-012370526-6.50001-5>.

(21) *Lichen Biology*; Cambridge; New York: Cambridge University Press, 2008.

(22) Fisher, J. F.; Meroueh, S. O.; Mobashery, S. Bacterial Resistance to β -Lactam Antibiotics: Compelling Opportunism, Compelling Opportunity. *Chem. Rev.* **2005**, *105* (2), 395–424. <https://doi.org/10.1021/cr030102i>.

(23) Cabanillas, F. Metabolic Abnormalities in Lymphoma. *Clin Lymphoma* **2002**, *3 Suppl 1*, S32-36. <https://doi.org/10.3816/clm.2002.s.013>.

(24) Bamforth, C. W. *Beer: Tap Into the Art and Science of Brewing*; Oxford University Press, 2023. <https://doi.org/10.1093/oso/9780199996742.001.0001>.

(25) WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240060241> (accessed 2025-06-06).

(26) Armstrong-James, D. Antifungal Chemotherapies and Immunotherapies for the Future. *Parasite Immunology* **2023**, *45* (2), e12960. <https://doi.org/10.1111/pim.12960>.

(27) Bongomin, F.; Gago, S.; Oladele, R. O.; Denning, D. W. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases-Estimate Precision. *J Fungi (Basel)* **2017**, *3* (4), 57. <https://doi.org/10.3390/jof3040057>.

(28) Chowdhary, A.; Sharma, C.; Meis, J. F. Candida Auris: A Rapidly Emerging Cause of Hospital-Acquired Multidrug-Resistant Fungal Infections Globally. *PLoS Pathog* **2017**, *13* (5), e1006290. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006290>.

(29) Lockhart, S. R.; Etienne, K. A.; Vallabhaneni, S.; Farooqi, J.; Chowdhary, A.; Govender, N. P.; Colombo, A. L.; Calvo, B.; Cuomo, C. A.; Desjardins, C. A.; Berkow, E. L.; Castanheira, M.; Magobo, R. E.; Jabeen, K.; Asghar, R. J.; Meis, J. F.; Jackson, B.; Chiller, T.; Litvintseva, A. P. Simultaneous Emergence of Multidrug-Resistant Candida Auris on 3 Continents Confirmed by Whole-Genome Sequencing and Epidemiological Analyses. *Clin Infect Dis* **2017**, *64* (2), 134–140. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw691>.

(30) CDC. *Candida auris*. *Candida auris* (C. auris). <https://www.cdc.gov/candida-auris/index.html> (accessed 2025-06-06).

(31) Hoenigl, M.; Seidel, D.; Carvalho, A.; Rudramurthy, S. M.; Arastehfar, A.; Gangneux, J.-P.; Nasir, N.; Bonifaz, A.; Araiza, J.; Klimko, N.; Serris, A.; Lagrou, K.; Meis, J. F.; Cornely, O. A.; Perfect, J. R.; White, P. L.; Chakrabarti, A.; ECMM and ISHAM collaborators. The Emergence of COVID-19 Associated Mucormycosis: A Review of Cases from 18 Countries. *Lancet Microbe* **2022**, *3* (7), e543–e552. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(21\)00237-8](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(21)00237-8).

(32) Jeong, W.; Keighley, C.; Wolfe, R.; Lee, W. L.; Slavin, M. A.; Kong, D. C. M.; Chen, S. C.-A. The Epidemiology and Clinical Manifestations of Mucormycosis: A Systematic Review and Meta-Analysis of Case Reports. *Clinical*

Microbiology and Infection **2019**, *25* (1), 26–34.
<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.07.011>.

(33) Özbek, L.; Topçu, U.; Manay, M.; Esen, B. H.; Bektas, S. N.; Aydın, S.; Özdemir, B.; Khostelidi, S. N.; Klimko, N.; Cornely, O.; Zakhour, J.; Kanj, S. S.; Seidel, D.; Hoenigl, M.; Ergönül, Ö. COVID-19–Associated Mucormycosis: A Systematic Review and Meta-Analysis of 958 Cases. *Clinical Microbiology and Infection* **2023**, *29* (6), 722–731. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2023.03.008>.

(34) Muthu, V.; Agarwal, R.; Rudramurthy, S. M.; Thangaraju, D.; Shevkani, M. R.; Patel, A. K.; Shastri, P. S.; Tayade, A.; Bhandari, S.; Gella, V.; Savio, J.; Madan, S.; Hallur, V.; Maturu, V. N.; Srinivasan, A.; Sethuraman, N.; Sibia, R. P. S.; Pujari, S.; Mehta, R.; Singhal, T.; Saxena, P.; Gupta, V.; Nagvekar, V.; Prayag, P.; Patel, D.; Xess, I.; Savaj, P.; Sehgal, I. S.; Panda, N.; Rajagopal, G. D.; Parwani, R. S.; Patel, K.; Deshmukh, A.; Vyas, A.; Gandra, R. R.; Sistla, S. K.; Padaki, P. A.; Ramar, D.; Sarkar, S.; Rachagulla, B.; Vallandaramam, P.; Premachandran, K. P.; Pawar, S.; Gugale, P.; Hosamani, P.; Dutt, S. N.; Nair, S.; Kalpakkam, H.; Badhwar, S.; Kompella, K. K.; Singla, N.; Navlakhe, M.; Prayag, A.; Singh, G.; Dhakecha, P.; Chakrabarti, A. Risk Factors, Mortality, and Predictors of Survival in COVID-19-Associated Pulmonary Mucormycosis: A Multicentre Retrospective Study from India. *Clinical Microbiology and Infection* **2024**, *30* (3), 368–374. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2023.12.006>.

(35) Pappas, P. G.; Alexander, B. D.; Andes, D. R.; Hadley, S.; Kauffman, C. A.; Freifeld, A.; Anaissie, E. J.; Brumble, L. M.; Herwaldt, L.; Ito, J.; Kontoyiannis, D. P.; Lyon, G. M.; Marr, K. A.; Morrison, V. A.; Park, B. J.; Patterson, T. F.; Perl, T. M.; Oster, R. A.; Schuster, M. G.; Walker, R.; Walsh, T. J.; Wannemuehler, K. A.; Chiller, T. M. Invasive Fungal Infections among Organ Transplant Recipients: Results of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET). *Clin Infect Dis* **2010**, *50* (8), 1101–1111. <https://doi.org/10.1086/651262>.

(36) Kauffman, C. A.; Freifeld, A. G.; Andes, D. R.; Baddley, J. W.; Herwaldt, L.; Walker, R. C.; Alexander, B. D.; Anaissie, E. J.; Benedict, K.; Ito, J. I.; Knapp, K. M.; Lyon, G. M.; Marr, K. A.; Morrison, V. A.; Park, B. J.; Patterson, T. F.; Schuster, M. G.; Chiller, T. M.; Pappas, P. G. Endemic Fungal Infections in Solid Organ and Hematopoietic Cell Transplant Recipients Enrolled in the Transplant-

Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET). *Transpl Infect Dis* **2014**, *16* (2), 213–224. <https://doi.org/10.1111/tid.12186>.

(37) Denning, D. W. Global Incidence and Mortality of Severe Fungal Disease. *Lancet Infect Dis* **2024**, *24* (7), e428–e438. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(23\)00692-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(23)00692-8).

(38) Patterson, T. F.; Thompson, G. R.; Denning, D. W.; Fishman, J. A.; Hadley, S.; Herbrecht, R.; Kontoyiannis, D. P.; Marr, K. A.; Morrison, V. A.; Nguyen, M. H.; Segal, B. H.; Steinbach, W. J.; Stevens, D. A.; Walsh, T. J.; Wingard, J. R.; Young, J.-A. H.; Bennett, J. E. Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Aspergillosis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* **2016**, *63* (4), e1–e60. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw326>.

(39) Donnelly, J. P.; Chen, S. C.; Kauffman, C. A.; Steinbach, W. J.; Baddley, J. W.; Verweij, P. E.; Clancy, C. J.; Wingard, J. R.; Lockhart, S. R.; Groll, A. H.; Sorrell, T. C.; Bassetti, M.; Akan, H.; Alexander, B. D.; Andes, D.; Azoulay, E.; Bialek, R.; Bradsher, R. W.; Bretagne, S.; Calandra, T.; Caliendo, A. M.; Castagnola, E.; Cruciani, M.; Cuenca-Estrella, M.; Decker, C. F.; Desai, S. R.; Fisher, B.; Harrison, T.; Heussel, C. P.; Jensen, H. E.; Kibbler, C. C.; Kontoyiannis, D. P.; Kullberg, B.-J.; Lagrou, K.; Lamoth, F.; Lehrnbecher, T.; Loeffler, J.; Lortholary, O.; Maertens, J.; Marchetti, O.; Marr, K. A.; Masur, H.; Meis, J. F.; Morrissey, C. O.; Nucci, M.; Ostrosky-Zeichner, L.; Pagano, L.; Patterson, T. F.; Perfect, J. R.; Racil, Z.; Roilides, E.; Ruhnke, M.; Prokop, C. S.; Shoham, S.; Slavin, M. A.; Stevens, D. A.; Thompson, G. R.; Vazquez, J. A.; Viscoli, C.; Walsh, T. J.; Warris, A.; Wheat, L. J.; White, P. L.; Zaoutis, T. E.; Pappas, P. G. Revision and Update of the Consensus Definitions of Invasive Fungal Disease From the European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Mycoses Study Group Education and Research Consortium. *Clin Infect Dis* **2020**, *71* (6), 1367–1376. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz1008>.

(40) Almeida, M. de A.; Almeida-Silva, F.; Guimarães, A. J.; Almeida-Paes, R.; Zancopé-Oliveira, R. M. The Occurrence of Histoplasmosis in Brazil: A Systematic Review. *International Journal of Infectious Diseases* **2019**, *86*, 147–156. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2019.07.009>.

(41) Mango, A. L. D.; Gomes, A. C. P.; Hochhegger, B.; Zanetti, G.; Marchiori, E. Computed Tomography Findings of Pulmonary Histoplasmosis:

Pictorial Essay. *Radiol Bras* **2023**, *56*, 162–167. <https://doi.org/10.1590/0100-3984.2022.0106-en>.

(42) Almeida, M. de A.; Almeida-Silva, F.; Guimarães, A. J.; Almeida-Paes, R.; Zancopé-Oliveira, R. M. The Occurrence of Histoplasmosis in Brazil: A Systematic Review. *Int J Infect Dis* **2019**, *86*, 147–156. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2019.07.009>.

(43) Chen, S. C.; Perfect, J.; Colombo, A. L.; Cornely, O. A.; Groll, A. H.; Seidel, D.; Albus, K.; de Almedia, J. N.; Garcia-Effron, G.; Gilroy, N. Global Guideline for the Diagnosis and Management of Rare Yeast Infections: An Initiative of the ECMM in Cooperation with ISHAM and ASM. *The Lancet Infectious Diseases* **2021**, *21* (12), e375–e386.

(44) Kauffman, C. A. Fungal Infections. *Proc Am Thorac Soc* **2006**, *3* (1), 35–40. <https://doi.org/10.1513/pats.200510-110JH>.

(45) Arastehfar, A.; Lass-Flörl, C.; Garcia-Rubio, R.; Daneshnia, F.; Ilkit, M.; Boekhout, T.; Gabaldon, T.; Perlin, D. S. The Quiet and Underappreciated Rise of Drug-Resistant Invasive Fungal Pathogens. *J Fungi (Basel)* **2020**, *6* (3), 138. <https://doi.org/10.3390/jof6030138>.

(46) Walsh, T. J.; Katragkou, A.; Chen, T.; Salvatore, C. M.; Roilides, E. Invasive Candidiasis in Infants and Children: Recent Advances in Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. *J Fungi (Basel)* **2019**, *5* (1), 11. <https://doi.org/10.3390/jof5010011>.

(47) Tashiro, M.; Takazono, T.; Izumikawa, K. Chronic Pulmonary Aspergillosis: Comprehensive Insights into Epidemiology, Treatment, and Unresolved Challenges. *Ther Adv Infect Dis* **2024**, *11*, 20499361241253751. <https://doi.org/10.1177/20499361241253751>.

(48) Truong, J.; Ashurst, J. V. Pneumocystis Jirovecii Pneumonia. In *StatPearls*; StatPearls Publishing: Treasure Island (FL), 2025.

(49) Sloan, D. J.; Parris, V. Cryptococcal Meningitis: Epidemiology and Therapeutic Options. *Clin Epidemiol* **2014**, *6*, 169–182. <https://doi.org/10.2147/CLEP.S38850>.

(50) de Azambuja, A. Z.; Wissmann Neto, G.; Watte, G.; Antonioli, L.; Goldani, L. Z. Cryptococcal Meningitis: A Retrospective Cohort of a Brazilian Reference Hospital in the Post-HAART Era of Universal Access. *Can J Infect Dis Med Microbiol* **2018**, *2018*, 6512468. <https://doi.org/10.1155/2018/6512468>.

(51) Perfect, J. R. The Impact of the Host on Fungal Infections. *The American Journal of Medicine* **2012**, *125* (1), S39–S51. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2011.10.010>.

(52) *Epidemiologia das infecções hematogênicas por Candida spp – Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. <https://rsbmt.org.br/2019/07/04/epidemiologia-das-infeccoes-hematogenicas-por-candida-spp/> (accessed 2025-06-06).

(53) Colombo, A. L.; Guimarães, T.; Camargo, L. F. A.; Richtmann, R.; Queiroz-Telles, F. de; Salles, M. J. C.; Cunha, C. A. da; Yasuda, M. A. S.; Moretti, M. L.; Nucci, M. Brazilian Guidelines for the Management of Candidiasis - a Joint Meeting Report of Three Medical Societies: Sociedade Brasileira de Infectologia, Sociedade Paulista de Infectologia and Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. *Braz J Infect Dis* **2013**, *17*, 283–312. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2013.02.001>.

(54) Hadley, S.; Lee, W. W.; Ruthazer, R.; Nasraway, S. A. Candidemia as a Cause of Septic Shock and Multiple Organ Failure in Nonimmunocompromised Patients. *Crit Care Med* **2002**, *30* (8), 1808–1814. <https://doi.org/10.1097/00003246-200208000-00023>.

(55) Delaloye, J.; Calandra, T. Invasive Candidiasis as a Cause of Sepsis in the Critically Ill Patient. *Virulence* **2014**, *5* (1), 161–169. <https://doi.org/10.4161/viru.26187>.

(56) Cabezas-Quintario, M. A.; Guerrero, C.; Gomez, P.; Perez-Fernandez, E. Prevalence of invasive fungal infections detected at necropsy in a medium-sized hospital: A 15-year review of autopsy findings. *Rev Esp Patol* **2016**, *49* (2), 76–80. <https://doi.org/10.1016/j.patol.2016.01.007>.

(57) Dunic, I.; Caetano, E. M.; Domingues, S. M.; Pantic, I.; Radovanovic, M.; Prada, L. R.; Nordstrom, C. W.; Antic, M.; Milovanovic, T.; Kotseva, M.; Singh, A.; Fnu, S. Clinical Characteristics, Diagnosis, Treatment, and Outcome of Patients with Liver Abscess Due to *Aspergillus* Spp: A Systematic Review of Published Cases. *BMC Infect Dis* **2024**, *24* (1), 345. <https://doi.org/10.1186/s12879-024-09226-y>.

(58) Spellberg, B.; Ibrahim, A. S. Recent Advances in the Treatment of Mucormycosis. *Curr Infect Dis Rep* **2010**, *12* (6), 423–429. <https://doi.org/10.1007/s11908-010-0129-9>.

(59) Cornely, O. A.; Alastruey-Izquierdo, A.; Arenz, D.; Chen, S. C. A.; Dannaoui, E.; Hochhegger, B.; Hoenigl, M.; Jensen, H. E.; Lagrou, K.; Lewis, R. E.; Mellinghoff, S. C.; Mer, M.; Pana, Z. D.; Seidel, D.; Sheppard, D. C.; Wahba, R.; Akova, M.; Alanio, A.; Al-Hatmi, A. M. S.; Arikian-Akdagli, S.; Badali, H.; Ben-Ami, R.; Bonifaz, A.; Bretagne, S.; Castagnola, E.; Chayakulkeeree, M.; Colombo, A. L.; Corzo-León, D. E.; Drgona, L.; Groll, A. H.; Guinea, J.; Heussel, C.-P.; Ibrahim, A. S.; Kanj, S. S.; Klimko, N.; Lackner, M.; Lamoth, F.; Lanternier, F.; Lass-Flöerl, C.; Lee, D.-G.; Lehrnbecher, T.; Lmimouni, B. E.; Mares, M.; Maschmeyer, G.; Meis, J. F.; Meletiadis, J.; Morrissey, C. O.; Nucci, M.; Oladele, R.; Pagano, L.; Pasqualotto, A.; Patel, A.; Racil, Z.; Richardson, M.; Roilides, E.; Ruhnke, M.; Seyedmousavi, S.; Sidharthan, N.; Singh, N.; Sinko, J.; Skiada, A.; Slavin, M.; Soman, R.; Spellberg, B.; Steinbach, W.; Tan, B. H.; Ullmann, A. J.; Vehreschild, J. J.; Vehreschild, M. J. G. T.; Walsh, T. J.; White, P. L.; Wiederhold, N. P.; Zaoutis, T.; Chakrabarti, A.; Mucormycosis ECMM MSG Global Guideline Writing Group. Global Guideline for the Diagnosis and Management of Mucormycosis: An Initiative of the European Confederation of Medical Mycology in Cooperation with the Mycoses Study Group Education and Research Consortium. *Lancet Infect Dis* **2019**, *19* (12), e405–e421. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(19\)30312-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(19)30312-3).

(60) Lass-Flörl, C.; Kanj, S. S.; Govender, N. P.; Thompson, G. R.; Ostrosky-Zeichner, L.; Govrins, M. A. Invasive Candidiasis. *Nat Rev Dis Primers* **2024**, *10* (1), 20. <https://doi.org/10.1038/s41572-024-00503-3>.

(61) Rajasingham, R.; Smith, R. M.; Park, B. J.; Jarvis, J. N.; Govender, N. P.; Chiller, T. M.; Denning, D. W.; Loyse, A.; Boulware, D. R. Global Burden of Disease of HIV-Associated Cryptococcal Meningitis: An Updated Analysis. *Lancet Infect Dis* **2017**, *17* (8), 873–881. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30243-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30243-8).

(62) Arastehfar, A.; Gabaldón, T.; Garcia-Rubio, R.; Jenks, J. D.; Hoenigl, M.; Salzer, H. J. F.; Ilkit, M.; Lass-Flörl, C.; Perlin, D. S. Drug-Resistant Fungi: An Emerging Challenge Threatening Our Limited Antifungal Armamentarium. *Antibiotics (Basel)* **2020**, *9* (12), 877. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9120877>.

(63) Guarner, J.; Brandt, M. E. Histopathologic Diagnosis of Fungal Infections in the 21st Century. *Clin Microbiol Rev* **2011**, *24* (2), 247–280. <https://doi.org/10.1128/CMR.00053-10>.

(64) Richardson, M. D. Changing Patterns and Trends in Systemic Fungal Infections. *J Antimicrob Chemother* **2005**, *56 Suppl 1*, i5–i11. <https://doi.org/10.1093/jac/dki218>.

(65) Laurent, F.; Benlala, I.; Dournes, G. Radiological Diagnosis of Pulmonary Aspergillosis. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine* **2024**, *45*, 50–60. <https://doi.org/10.1055/s-0043-1776998>.

(66) Greene, R. E.; Schlamm, H. T.; Oestmann, J.-W.; Stark, P.; Durand, C.; Lortholary, O.; Wingard, J. R.; Herbrecht, R.; Ribaud, P.; Patterson, T. F.; Troke, P. F.; Denning, D. W.; Bennett, J. E.; de Pauw, B. E.; Rubin, R. H. Imaging Findings in Acute Invasive Pulmonary Aspergillosis: Clinical Significance of the Halo Sign. *Clin Infect Dis* **2007**, *44* (3), 373–379. <https://doi.org/10.1086/509917>.

(67) Pfeiffer, C. D.; Fine, J. P.; Safdar, N. Diagnosis of Invasive Aspergillosis Using a Galactomannan Assay: A Meta-Analysis. *Clin Infect Dis* **2006**, *42* (10), 1417–1427. <https://doi.org/10.1086/503427>.

(68) White, P. L.; Barnes, R. A.; Springer, J.; Klingspor, L.; Cuenca-Estrella, M.; Morton, C. O.; Lagrou, K.; Bretagne, S.; Melchers, W. J. G.; Mengoli, C.; Donnelly, J. P.; Heinz, W. J.; Loeffler, J.; EAPCRI. Clinical Performance of Aspergillus PCR for Testing Serum and Plasma: A Study by the European Aspergillus PCR Initiative. *J Clin Microbiol* **2015**, *53* (9), 2832–2837. <https://doi.org/10.1128/JCM.00905-15>.

(69) Seng, P.; Rolain, J.-M.; Fournier, P. E.; La Scola, B.; Drancourt, M.; Raoult, D. MALDI-TOF-Mass Spectrometry Applications in Clinical Microbiology. *Future Microbiol* **2010**, *5* (11), 1733–1754. <https://doi.org/10.2217/fmb.10.127>.

(70) Carbonnelle, E.; Mesquita, C.; Bille, E.; Day, N.; Dauphin, B.; Beretti, J.-L.; Ferroni, A.; Gutmann, L.; Nassif, X. MALDI-TOF Mass Spectrometry Tools for Bacterial Identification in Clinical Microbiology Laboratory. *Clin Biochem* **2011**, *44* (1), 104–109. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2010.06.017>.

(71) Mehmandoust, M.; Gumus, Z. P.; Soylak, M.; Erk, N. Electrochemical Immunosensor for Rapid and Highly Sensitive Detection of SARS-CoV-2 Antigen in the Nasal Sample. *Talanta* **2022**, *240*, 123211. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.123211>.

(72) Díaz-Fernández, A.; Bernalte, E.; Fernández-Ramos, C.; Moise, S.; Estrela, P.; Di Lorenzo, M. An Impedimetric Immunosensor for the Selective

Detection of CD34+ T-Cells in Human Serum. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2022**, 356, 131306. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2021.131306>.

(73) Ogungbile, A. O.; Ashur, I.; Icin, I.; Shapiro, O. H.; Vernick, S. Rapid Detection and Quantification of Microcystins in Surface Water by an Impedimetric Immunosensor. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2021**, 348, 130687. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2021.130687>.

(74) Li, Y.; Duan, J.; Wang, Y.; Teng, L.; Liu, H.; Li, J.; Liu, M.; He, W.; Hu, H.; Wang, L.; Lyu, W.; Liao, Y. Cu-Mediated Bipolar-Type Extended π -Conjugated Microporous Polymers for Lithium-Ion Battery Cathodes with High Energy Density and Fast-Charging Capability. *Chemical Science* **2025**. <https://doi.org/10.1039/D4SC08244C>.

(75) Mutreja, R.; Jariyal, M.; Pathania, P.; Sharma, A.; Sahoo, D. K.; Suri, C. R. Novel Surface Antigen Based Impedimetric Immunosensor for Detection of *Salmonella Typhimurium* in Water and Juice Samples. *Biosensors and Bioelectronics* **2016**, 85, 707–713. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.05.079>.

(76) Fdez-Sanromán, A.; Bernárdez-Rodas, N.; Rosales, E.; Pazos, M.; González-Romero, E.; Sanromán, M. Á. Biosensor Technologies for Water Quality: Detection of Emerging Contaminants and Pathogens. *Biosensors (Basel)* **2025**, 15 (3), 189. <https://doi.org/10.3390/bios15030189>.

(77) *Immunoassay*; San Diego : Academic Press, 1996.

(78) Aydin, S. A Short History, Principles, and Types of ELISA, and Our Laboratory Experience with Peptide/Protein Analyses Using ELISA. *Peptides* **2015**, 72, 4–15. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.04.012>.

(79) Horns, F.; Dekker, C. L.; Quake, S. R. Memory B Cell Activation, Broad Anti-Influenza Antibodies, and Bystander Activation Revealed by Single-Cell Transcriptomics. *Cell Rep* **2020**, 30 (3), 905-913.e6. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.12.063>.

(80) Clem, A. S. Fundamentals of Vaccine Immunology. *J Glob Infect Dis* **2011**, 3 (1), 73–78. <https://doi.org/10.4103/0974-777X.77299>.

(81) Han, Y.; Gao, H.; Xu, J.; Luo, J.; Han, B.; Bao, J.; Pan, G.; Li, T.; Zhou, Z. Innate and Adaptive Immune Responses Against Microsporidia Infection in Mammals. *Front Microbiol* **2020**, 11, 1468. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01468>.

(82) Duan, L.; Mukherjee, E. Janeway's Immunobiology, Ninth Edition. *Yale J Biol Med* **2016**, *89* (3), 424–425.

(83) Schroeder, H. W.; Cavacini, L. Structure and Function of Immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol* **2010**, *125* (2 Suppl 2), S41-52. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.046>.

(84) Bowen, A.; Casadevall, A. Chapter 6 - The Role of the Constant Region in Antibody-Antigen Interactions: Redefining the Modular Model of Immunoglobulin Structure. In *Structural Biology in Immunology*; Putterman, C., Cowburn, D., Almo, S., Eds.; Academic Press, 2018; pp 145–170. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803369-2.00006-1>.

(85) Moser, M.; Leo, O. Key Concepts in Immunology. *Vaccine* **2010**, *28 Suppl 3*, C2-13. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.07.022>.

(86) ISBN: 978-0-495-55828-6. *Fundamentos De Quimica Analitica 9na Edición*; 2014.

(87) Felix, F. S.; Angnes, L. Electrochemical Immunosensors – A Powerful Tool for Analytical Applications. *Biosensors and Bioelectronics* **2018**, *102*, 470–478. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.11.029>.

(88) Oliveira, T. R. de. Desenvolvimento de imunossensores microfluídicos descartáveis para detecção de biomarcadores visando o diagnóstico precoce da doença de Alzheimer. **2019**.

(89) Wild, D. Preface. In *The Immunoassay Handbook (Fourth Edition)*; Wild, D., Ed.; Elsevier: Oxford, 2013; pp xi–xiii. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-097037-0.05001-6>.

(90) Ronkainen, N. J.; Halsall, H. B.; Heineman, W. R. Electrochemical Biosensors. *Chem Soc Rev* **2010**, *39* (5), 1747–1763. <https://doi.org/10.1039/b714449k>.

(91) Victor Luiz de Matos Franco; Larissa de Oliveira Cassini Marques; Sérgio Gabriel Soares Diniz. A Técnica de Elisa e a Sua Importância Para o Diagnóstico Clínico / The Elisa Technique and Its Importance for Clinical Diagnosis. *ResearchGate*. <https://doi.org/10.34117/bjdv7n9-243>.

(92) Wang, W.; Volkow, N. D.; Berger, N. A.; Davis, P. B.; Kaelber, D. C.; Xu, R. Association of Semaglutide with Risk of Suicidal Ideation in a Real-World Cohort. *Nat Med* **2024**, *30* (1), 168–176. <https://doi.org/10.1038/s41591-023-02672-2>.

(93) Kim, D.; Herdeis, L.; Rudolph, D.; Zhao, Y.; Böttcher, J.; Vides, A.; Ayala-Santos, C. I.; Pourfarjam, Y.; Cuevas-Navarro, A.; Xue, J. Y.; Mantoulidis, A.; Bröker, J.; Wunberg, T.; Schaaf, O.; Popow, J.; Wolkerstorfer, B.; Kropatsch, K. G.; Qu, R.; de Stanchina, E.; Sang, B.; Li, C.; McConnell, D. B.; Kraut, N.; Lito, P. Pan-KRAS Inhibitor Disables Oncogenic Signalling and Tumour Growth. *Nature* **2023**, *619* (7968), 160–166. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06123-3>.

(94) Justino, C. I. L.; Duarte, A. C.; Rocha-Santos, T. A. P. Recent Progress in Biosensors for Environmental Monitoring: A Review. *Sensors (Basel)* **2017**, *17* (12), 2918. <https://doi.org/10.3390/s17122918>.

(95) Dincer, C.; Bruch, R.; Kling, A.; Dittrich, P. S.; Urban, G. A. Multiplexed Point-of-Care Testing - xPOCT. *Trends Biotechnol* **2017**, *35* (8), 728–742. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.03.013>.

(96) Turner, A. P. F. Biosensors: Sense and Sensibility. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42* (8), 3184–3196. <https://doi.org/10.1039/C3CS35528D>.

(97) Ronkainen, N. J.; Halsall, H. B.; Heineman, W. R. Electrochemical Biosensors. *Chem Soc Rev* **2010**, *39* (5), 1747–1763. <https://doi.org/10.1039/b714449k>.

(98) Homola, J. Surface Plasmon Resonance Sensors for Detection of Chemical and Biological Species. *Chem. Rev.* **2008**, *108* (2), 462–493. <https://doi.org/10.1021/cr068107d>.

(99) Costa, I. C.; Felipe, I.; Gaziri, L. C. J. Resposta imune a *Candida albicans*. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde* **2008**, *29* (1), 27–40. <https://doi.org/10.5433/1679-0367.2008v29n1p27>.

(100) Romani, L. Immunity to Fungal Infections. *Nat Rev Immunol* **2011**, *11* (4), 275–288. <https://doi.org/10.1038/nri2939>.

(101) Lorenz, M. C.; Fink, G. R. Life and Death in a Macrophage: Role of the Glyoxylate Cycle in Virulence. *Eukaryot Cell* **2002**, *1* (5), 657–662. <https://doi.org/10.1128/EC.1.5.657-662.2002>.

(102) Wang, J. Electrochemical Glucose Biosensors. *Chem Rev* **2008**, *108* (2), 814–825. <https://doi.org/10.1021/cr068123a>.

(103) Mohan, A. M. V. CHAPTER 4 - Nanomaterials-Based Disposable Electrochemical Devices for Point-of-Care Diagnosis. In *Advanced Nanomaterials for Point of Care Diagnosis and Therapy*; Dave, S., Das, J., Ghosh,

S., Eds.; Elsevier, 2022; pp 53–80. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85725-3.00025-8>.

(104) Martínez-Periñán, E.; Gutiérrez-Sánchez, C.; García-Mendiola, T.; Lorenzo, E. Electrochemiluminescence Biosensors Using Screen-Printed Electrodes. *Biosensors (Basel)* **2020**, *10* (9), 118. <https://doi.org/10.3390/bios10090118>.

(105) Paimard, G.; Ghasali, E.; Baeza, M. Screen-Printed Electrodes: Fabrication, Modification, and Biosensing Applications. *Chemosensors* **2023**, *11* (2), 113. <https://doi.org/10.3390/chemosensors11020113>.

(106) Silva, P. R. L. da. Desenvolvimento de magneto-imunoensaios para detecção de anticorpos em amostras de plasma e aplicação no diagnóstico da COVID-19 e da COVID longa. **2024**.

(107) Sher, M.; Faheem, A.; Asghar, W.; Cinti, S. Nano-Engineered Screen-Printed Electrodes: A Dynamic Tool for Detection of Viruses. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2021**, *143*, 116374. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116374>.

(108) Beitollahi, H.; Mohammadi, S. Z.; Safaei, M.; Tajik, S. Applications of Electrochemical Sensors and Biosensors Based on Modified Screen-Printed Electrodes: A Review. *Anal. Methods* **2020**, *12* (12), 1547–1560. <https://doi.org/10.1039/C9AY02598G>.

(109) Zhenguo Zhang; Yulin Cong; Yichun Huang; Xin Du. *Nanomaterials-Based Electrochemical Immunosensors*. <https://www.mdpi.com/2072-666X/10/6/397> (accessed 2025-06-07).

(110) Materón, E. M.; Miyazaki, C. M.; Carr, O.; Joshi, N.; Picciani, P. H. S.; Dalmaschio, C. J.; Davis, F.; Shimizu, F. M. Magnetic Nanoparticles in Biomedical Applications: A Review. *Applied Surface Science Advances* **2021**, *6*, 100163. <https://doi.org/10.1016/j.apsadv.2021.100163>.

(111) Zumpano, R.; Manghisi, M.; Polli, F.; D'Agostino, C.; Ietto, F.; Favero, G.; Mazzei, F. Label-Free Magnetic Nanoparticles-Based Electrochemical Immunosensor for Atrazine Detection. *Anal Bioanal Chem* **2022**, *414* (6), 2055–2064. <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03838-y>.

(112) Paul, S.; Nadendla, S.; Sobhia, M. E. Identification of Potential ACE2-Derived Peptide Mimetics in SARS-CoV-2 Omicron Variant

Therapeutics Using Computational Approaches. *J Phys Chem Lett* **2022**, *13* (32), 7420–7428. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcllett.2c01155>.

(113) Wang, R.; Lorantfy, B.; Fusco, S.; Olsson, L.; Franzén, C. J. Analysis of Methods for Quantifying Yeast Cell Concentration in Complex Lignocellulosic Fermentation Processes. *Sci Rep* **2021**, *11* (1), 11293. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-90703-8>.

(114) Figueiredo, A. B. C. *Desenvolvimento e caracterização de anticorpo monoclonal anti-quitooligômeros como potencial ferramenta no tratamento de infecções fúngicas*.

(115) Turkevich, J.; Stevenson, P. C.; Hillier, J. A Study of the Nucleation and Growth Processes in the Synthesis of Colloidal Gold. *Discuss. Faraday Soc.* **1951**, *11* (0), 55–75. <https://doi.org/10.1039/DF9511100055>.

(116) Fonseca, W. T. da. *Desenvolvimento de método eletroanalítico utilizando sensores eletroquímicos descartáveis para detecção do biomarcador miRNA-203 visando o diagnóstico de câncer de cabeça e pescoço*.

(117) Afonso, A. S.; Uliana, C. V.; Martucci, D. H.; Faria, R. C. Simple and Rapid Fabrication of Disposable Carbon-Based Electrochemical Cells Using an Electronic Craft Cutter for Sensor and Biosensor Applications. *Talanta* **2016**, *146*, 381–387. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.09.002>.

(118) de Oliveira, T. R.; Fonseca, W. T.; de Oliveira Setti, G.; Faria, R. C. Fast and Flexible Strategy to Produce Electrochemical Paper-Based Analytical Devices Using a Craft Cutter Printer to Create Wax Barrier and Screen-Printed Electrodes. *Talanta* **2019**, *195*, 480–489. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.11.047>.

(119) Cardoso, R. M.; Kalinke, C.; Rocha, R. G.; dos Santos, P. L.; Rocha, D. P.; Oliveira, P. R.; Janegitz, B. C.; Bonacin, J. A.; Richter, E. M.; Munoz, R. A. A. Additive-Manufactured (3D-Printed) Electrochemical Sensors: A Critical Review. *Analytica Chimica Acta* **2020**, *1118*, 73–91. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.03.028>.

(120) Nascimento, E. D. *Utilização de um sensor eletroquímico descartável para o diagnóstico rápido da COVID-19 por meio da detecção da proteína Spike do vírus SARS-CoV-2*.

(121) Leau, S. A.; Lete, C.; Matei, C.; Lupu, S. Electrochemical Sensing Platform Based on Metal Nanoparticles for Epinephrine and Serotonin. *Biosensors (Basel)* **2023**, *13* (8), 781. <https://doi.org/10.3390/bios13080781>.

(122) *Dynabeads® MyOne™ Carboxylic Acid - BR*. <https://www.thermofisher.com/br/en/home/references/protocols/proteins-expression-isolation-and-analysis/protein-isolation-protocol/dynabeads-myone-carboxylic-acid.html> (accessed 2025-06-09).

(123) Douglas C. Montgomery. (PDF) *Design and Analysis of Experiments*. ResearchGate. https://www.researchgate.net/publication/361342853_Design_and_Analysis_of_Experiments (accessed 2025-06-09).

(124) *Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments, 4th Edition* | Wiley. Wiley.com. <https://www.wiley.com/en-us/Response+Surface+Methodology%3A+Process+and+Product+Optimization+Using+Designed+Experiments%2C+4th+Edition-p-9781118916018> (accessed 2025-06-09).

(125) Ferreira, S. L. C.; Bruns, R. E.; Ferreira, H. S.; Matos, G. D.; David, J. M.; Brandão, G. C.; da Silva, E. G. P.; Portugal, L. A.; dos Reis, P. S.; Souza, A. S.; dos Santos, W. N. L. Box-Behnken Design: An Alternative for the Optimization of Analytical Methods. *Anal Chim Acta* **2007**, *597* (2), 179–186. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.07.011>.

(126) Pereira, F. M. V.; Pereira-Filho, E. R. APLICAÇÃO DE PROGRAMA COMPUTACIONAL LIVRE EM PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS: UM TUTORIAL. *Quím. Nova* **2018**, *41*, 1061–1071. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170254>.

(127) Nie, Z.; Nijhuis, C. A.; Gong, J.; Chen, X.; Kumachev, A.; Martinez, A. W.; Narovlyansky, M.; Whitesides, G. M. Electrochemical Sensing in Paper-Based Microfluidic Devices. *Lab Chip* **2010**, *10* (4), 477–483. <https://doi.org/10.1039/B917150A>.

(128) Bard, A. J.; Faulkner, L. R. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, 2. edition.; Wiley: New York Weinheim, 2001.

(129) García-Miranda Ferrari, A.; Rowley-Neale, S. J.; Banks, C. E. Screen-Printed Electrodes: Transitioning the Laboratory in-to-the Field. *Talanta Open* **2021**, *3*, 100032. <https://doi.org/10.1016/j.talo.2021.100032>.

(130) Musa, A. M.; Kiely, J.; Luxton, R.; Honeychurch, K. C. Recent Progress in Screen-Printed Electrochemical Sensors and Biosensors for the Detection of Estrogens. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2021**, *139*, 116254. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116254>.