



UFG

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

MARX OSÓRIO ARAÚJO PEREIRA

**IMUNOSSENSOR IMPEDIMÉTRICO PARA DETECÇÃO DE IgG
ANTI-FEBRE MACULOSA EM PLASMA SANGUÍNEO**

Goiânia

2026



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação Tese Outro*: _____

*No caso de mestrado/doutorado profissional, indique o formato do Trabalho de Conclusão de Curso, permitido no documento de área, correspondente ao programa de pós-graduação, orientado pela legislação vigente da CAPES.

Exemplos: Estudo de caso ou Revisão sistemática ou outros formatos.

2. Nome completo do autor

MARX OSÓRIO ARAÚJO PEREIRA

3. Título do trabalho

IMUNOSSENSOR IMPEDIMÉTRICO PARA DETECÇÃO DE IgG ANTI-FEBRE MACULOSA EM PLASMA SANGUÍNEO

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

a) consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);

b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação. O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Marx Osorio Araujo Pereira, Discente**, em 04/05/2026, às 15:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Eric De Souza Gil, Professor do Magistério Superior**, em 04/05/2026, às 15:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **6170714** e o código CRC **1AD0BAEC**.

MARX OSÓRIO ARAÚJO PEREIRA

**IMUNOSSENSOR IMPEDIMÉTRICO PARA DETECÇÃO DE IgG
ANTI-FEBRE MACULOSA EM PLASMA SANGUÍNEO**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos

Orientador: Dr. Eric de Souza Gil.

Co-Orientador: Dr. Edson Sílvio Batista Rodrigues.

Goiânia

2026

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

Pereira, Marx Osório Araújo
IMUNOSENSOR IMPEDIMÉTRICO PARA DETECÇÃO DE IgG ANTI-
FEBRE MACULOSA EM AMOSTRAS DE PLASMA SANGUÍNEO [manuscrito] /
Marx Osório Araújo Pereira. - 2026.
59 f.: 2026

Orientador: Prof. Dr. Eric de Souza Gil; co-orientador: Dr. Edson Sílvio Batista Rodrigues

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Faculdade Farmácia (FF), Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Goiânia, 2026.

Bibliografia.

Inclui: siglas, símbolos, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Febre Maculosa Brasileira. 2. Imunossensor. 3. Igg.

I. Gil, Eric de Souza , orient. II. Rodrigues, Edson Sílvio Batista , co-orient. III. Título.

CDU 615.1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

FACULDADE DE FARMÁCIA

ATA DE DEFESA DE TESE

Ata Nº **299** da sessão de Defesa de Tese de **MARX OSÓRIO ARAÚJO PEREIRA** que confere o título de Doutor em **Ciências Farmacêuticas**, na área de concentração em **Fármacos e Medicamentos**.

Aos **vinte e dois dias do mês de abril de dois mil e vinte e seis**, na sala de defesa - 4º andar - Faculdade de Farmácia, realizou-se a sessão pública de Defesa de Tese intitulada **“IMUNOSSENSOR IMPEDIMÉTRICO PARA DETECÇÃO DE IgG ANTI-FEBRE MACULOSA EM PLASMA SANGUÍNEO”**. Os trabalhos foram instalados pelo Orientador, **Professor Doutor Eric de Souza Gil (FF/UFG)**, com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: **Professor Doutor Álvaro Ferreira Júnior (EVZ/UFG)**, membro titular externo; **Professor Doutor Isaac Yves Lopes de Macedo (IQ/UFG)**, membro titular externo; **Professor Doutor Luís Antônio Dantas Silva (FF/UFG)**, membro titular interno; **Professora Doutora Livia Florio Sgobbi (IQ/UFG)**, membro titular externo. Durante a arguição os membros da banca **não fizeram** sugestão de alteração do título do trabalho. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Dissertação tendo sido o candidato **aprovado** pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo **Professor Doutor Eric de Souza Gil (FF/UFG)**, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, aos **vinte e dois dias do mês de abril de dois mil e vinte e seis**.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA



Documento assinado eletronicamente por **Eric De Souza Gil, Professor do Magistério Superior**, em 22/04/2026, às 13:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luis Antonio Dantas Silva, Professor do Magistério Superior**, em 22/04/2026, às 14:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Livia Florio Sgobbi, Professor do Magistério Superior**, em 22/04/2026, às 17:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Alvaro Ferreira Junior, Professor do Magistério Superior**, em 22/04/2026, às 18:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Isaac Yves Lopes De Macêdo, Usuário Externo**, em 22/04/2026, às 18:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **6139415** e o código CRC **E311FC53**.

Referência: Processo nº 23070.019821/2026-39

SEI nº 6139415



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Coordenador do Programa de Pós-Graduação

Prof. Dr. José Realino de Paula

Vice-Coordenador do Programa de Pós-Graduação

Prof(a) Dr(a). Ana Carolina Kogawa

Goiânia-GO

2026



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

BANCA EXAMINADORA

Aluno(a): Marx Osório Araújo Pereira

Orientador(a): Eric de Souza Gil

Eric de Souza Gil

Professor Titular da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, FF/UFG.

Álvaro Ferreira Júnior / Membro Titular

Professor Titular da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás,
EVZ/UFG.

Isaac Yves Lopes de Macedo / Membro Titular

Pós-Doutorado pelo Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás, IQ/UFG.

Luís Antônio Dantas Silva / Membro Titular

Professor Adjunto da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, FF/UFG.

Lívia Flório Sgobbi / Membro Titular

Professora Adjunta do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás, FF/UFG.

Virgínia Farias Alves / Membro Suplente

Professora Associada da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás,
FF/UFG.

Luiz Carlos da Cunha / Membro Suplente

Professor Titular da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, FF/UFG.

Data: 22 de abril de 2026

Agradeço ao universo pela sua infinita infinitude e ao ser superior que o governa;

À ciência pela contribuição para melhorar a humanidade e a mim que faço parte dela;

À minha digníssima companheira Beatriz Santos Gontijo, pelo apoio, por acreditar até o fim, mesmo quando nem eu acreditei que seria possível chegar até aqui;

Ao Professor Dr. Eric de Souza Gil, pelo acolhimento, orientação, inspiração e oportunidades que sempre fizeram toda a diferença na minha trajetória acadêmica;

Aos colegas do LAFAM e de todos os locais de pesquisa por onde passei, muito obrigado pela parceria e ajuda;

À Faculdade de Farmácia da UFG, minha segunda casa científica e local onde coisas maravilhosas acontecem;

À CAPES pelo apoio financeiro e oportunidade de trabalhar pela ciência de nosso país;

A todos os que acreditam na ciência e no trabalho sério dos pesquisadores e pesquisadoras que existem e que ainda irão existir.

“Somos quem podemos ser, sonhos que podemos ter...”

— Humberto Gessinger.

HUMBERTO GESSINGER é um músico, cantor, compositor e poeta brasileiro, conhecido principalmente por ter sido líder e fundador da banda de rock Engenheiros do Hawaii.

IMUNOSSENSOR IMPEDIMÉTRICO PARA DETECÇÃO DE IgG ANTI-FEBRE MACULOSA EM PLASMA SANGUÍNEO

Marx Osório Araújo Pereira¹, Álvaro Ferreira Júnior², Edson Sílvio Batista Rodrigues¹, Helena Mulser¹, Giovanna Nascimento de Mello e Silva¹, Wallans Torres Pio dos Santos³, Eric de Souza Gil¹

¹LAFAM – Laboratório de Análise Farmacêutica e Ambiental, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás – UFG;

²FUNGILAB-Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás-UFG;

³Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri-UFVJM.

Introdução: A Febre Maculosa Brasileira (FMB) é uma doença grave e de importância médica, devido à sua rápida evolução e alta letalidade. A eficácia do tratamento depende principalmente do diagnóstico rápido, atualmente realizado por meio de testes de imunofluorescência indireta e PCR, que exigem altos custos e boa estrutura laboratorial. **Objetivo:** Desenvolver um imunossensor impedimétrico sem marcação baseado em imobilização de anticorpo IgY para detecção de IgG anti-Febre Maculosa Brasileira em amostras de plasma sanguíneo de capivara. **Métodos:** A fim de propor uma metodologia alternativa, foi desenvolvido um imunossensor impedimétrico (IM) baseado na imobilização de anticorpos IgY específicos para IgG anti-*Rickettsia rickettsii* utilizando plasma sanguíneo de capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) para caracterização, validação e aplicações de IM pronto, utilizando um eletrodo de carbono vítreo como superfície que foi primeiramente ativada por cronoamperometria por 10 minutos para ativação da mesma, com leituras de Voltametria Cíclica e Espectroscopia de Impedância Eletroquímica entre as etapas, seguida de imobilização do IgY por *drop casting*, bloqueio da superfície restante com caseína e análise das amostras e anticorpos purificados. **Resultados e Discussão:** A seletividade do IM foi observada ao comparar-se as leituras de IgG reagente (IgGcr) de capivara com IgG não reagente (IgGnr). Foi obtida uma curva de calibração de IgG reagente, a partir da qual foram calculados os Limites de Detecção (LOD) e Quantificação (LOQ) de 1,3 ng.mL⁻¹ e 4,4 ng.mL⁻¹, respectivamente. Os testes de acurácia mostraram que diferentes concentrações de IgGcr apresentaram desvio máximo de 20,0%, com Intervalo de Confiança entre 90,00% e 95,00%. Os testes de precisão intermediária mostraram desvio padrão relativo de 2,09% para o pesquisador 1 e 2,61% do pesquisador 2, e o teste F não demonstrou diferença significativa entre os valores de recuperação encontrados entre os dois analistas, uma vez que $F_{cal} 1,56 < 5,05$ e $P\text{-valor } 0,48 > 0,05$. **Conclusão:** Portanto, foi desenvolvido um imunossensor impedimétrico para detectar IgG anti-FMB no plasma sanguíneo de capivara, o que contribui significativamente para a melhoria dos testes diagnósticos, redução de custos e facilidade de execução.

Palavras-chave: Febre Maculosa Brasileira, Imunossensor, IgG.

Agradecimentos: CAPES.

IMPEDIMETRIC IMMUNOSENSOR FOR DETECTION OF ANTI-SPOTTED FEVER IgG IN BLOOD PLASMA

Marx Osório Araújo Pereira¹, Álvaro Ferreira Júnior², Edson Sílvio Batista Rodrigues¹, Helena Mulser¹, Giovanna Nascimento de Mello e Silva¹, Wallans Torres Pio dos Santos³, Eric de Souza Gil¹

¹LAFAM – Laboratory of Pharmaceutical and Environmental Analysis, School of Pharmacy, Federal University of Goiás – UFG;

²FUNGILAB – School of Veterinary Medicine and Animal Science, Federal University of Goiás-UFG;

³Federal University of the Jequitinhonha and Mucuri Valleys-UFVJM.

Introduction: Brazilian Spotted Fever (BSF) is a serious and medically important disease due to its rapid progression and high mortality rate. Treatment efficacy depends primarily on rapid diagnosis, currently performed through indirect immunofluorescence and PCR tests, which are costly and require extensive laboratory support. **Objective:** To develop a label-free impedimetric immunosensor based on IgY antibody immobilization for the detection of anti-Brazilian Spotted Fever IgG in capybara blood plasma samples. **Methods:** To propose an alternative methodology, an impedimetric immunosensor (IM) was developed based on the immobilization of IgY antibodies specific for anti-Rickettsia rickettsii IgG using capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) blood plasma for characterization, validation, and applications of a ready-made IM, using a glassy carbon electrode as a surface, which was first activated by chronoamperometry for 10 minutes, with Cyclic Voltammetry and Electrochemical Impedance Spectroscopy readings between steps, followed by IgY immobilization by drop casting, blocking of the remaining surface with casein, and analysis of the purified samples and antibodies. **Results and Discussion:** The selectivity of the IM was observed when comparing the readings of capybara-reactive IgG (IgGcr) with non-reactive IgG (IgGnr). A reagent IgG calibration curve was obtained, from which the Limits of Detection (LOD) and Quantification (LOQ) of 1.3 ng.mL⁻¹ and 4.4 ng.mL⁻¹, respectively, were calculated. Accuracy tests showed that different concentrations of IgGcr presented a maximum deviation of 20.0%, with CI between 90.00% and 95.00%. Intermediate precision tests showed a relative standard deviation of 2.09% for researcher 1 and 2.61% for researcher 2, and the F test showed no significant difference between the recovery values found by the two analysts, since $F_{cal} 1.56 < 5.05$ and $P\text{-value } 0.48 > 0.05$. **Conclusion:** Therefore, an impedimetric immunosensor was developed to detect anti-BSF IgG in capybara blood plasma, which significantly contributes to improving diagnostic tests, reducing costs, and facilitating performance.

Keywords: Brazilian Spotted Fever, Immunosensor, IgG.

Acknowledgements: CAPES.

Figura 1: Estrutura do anticorpo IgG (1a.) e suas diferentes classes (1b.).	20
Figura 2: Uma visão geral do tecido linfóide do sistema imunológico das aves em comparação com o dos mamíferos e a posição evolutiva desses animais. APC: células apresentadoras de antígenos; MHC: complexo principal de histocompatibilidade; Ig: imunoglobulina.	22
Figura 3: Estrutura de IgY e IgG. V = domínio variável da cadeia leve (VL) e da cadeia pesada (VH); C = domínio constante da cadeia leve (CL) e da cadeia pesada (CH).	23
Figura 4: Esquema do mecanismo do teste de Imunofluorescência Indireta.	25
Figura 5: Esquema da reação em Cadeia de Polimerase (PCR).	26
Figura 6: Imagem de uma célula eletroquímica de 3 eletrodos. ER: Eletrodo de Referência; ET: Eletrodo de Trabalho; CE: Contra-eletrodo.	30
Figura 7: Esquema de funcionamento do Imunossensor eletroquímico.	33
Figura 8: Processo de obtenção do anticorpo IgY.	40
Figura 9: Representação esquemática da preparação do imunossensor e detecção de IgG. Etapa 1: ativação eletroquímica da superfície; etapa 2: Imobilização do anticorpo; etapa 3: bloqueio por CAS e etapa 4: detecção de IgG via EIS.	41
Figura 10: Diagramas de Nyquist e medidas de CV (inserção) dos estágios de modificação da GCE. (A) Ativação da GCE por cronoamperometria; (B) Etapa de ligação de IgY; (C) imersão da GCE com IgY em solução de caseína; (D) teste de imunossensor de IgY em plasma sanguíneo de capivara.	45
Figura 11: Circuito equivalente de Randles usado como modelo de ajuste para dados de impedância. R_s : resistência da solução; R_{ct} : resistência de transferência de carga; W: impedância de Warburg; CPE: elemento de fase constante.	47
Figura 12: Diagramas de Nyquist (A) para concentrações de IgG de 20, 28, 36, 50, 80, 100 e 120 ng mL ⁻¹ e a curva de calibração resultante usando o imunossensor desenvolvido (B). Todas as medições foram realizadas em triplicata.	47

Figura 13: Medidas de CV (A) e gráficos de Nyquist (B) em plasma de capivara reagente (controle positivo), plasma de capivara não-reactivo e plasma de coelho. ...50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Efeito do bloqueio de CAS no eletrodo descoberto na estabilização do sinal usando diferentes tempos de incubação de IgG de capivara.....	46
Tabela 2: Análise estatística dos resultados obtidos.	48
Tabela 3: Testes de recuperação com o imunossensor desenvolvido a partir de amostras enriquecidas com diferentes concentrações de IgG de capivara.	50
Tabela 4: Valores de precisão e repetibilidade do imunossensor.....	52

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Comparação entre testes utilizados em pesquisa para detecção de Febre Maculosa.....	27
Quadro 2: Tipos de Biossensor de acordo com o tipo de sinal.	29
Quadro 3: Tipos de Biossensor de acordo com a natureza do agente a ser imobilizado.	31
Quadro 4: Aplicações de Imunossensores dos últimos cinco anos (2020-2025).....	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ac	Anticorpo
AGCE	Eletrodo de Carbono Vítreo Ativado
AGCE/Ab	Eletrodo de Carbono Vítreo Ativado ligado a Anticorpo
AGCE/AbCAS	Eletrodo Ativado Ligado a Anticorpo e Caseína
APC	Células Apresentadoras de Antígenos
BHV-1	Vírus do Herpes Bovino-1
BT	Bilirrubinas
CAS	Caseína
CK	Creatinoquinase
CPE	Elemento de Fase Constante
CV	Voltametria Cíclica
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DPR	Desvio Padrão Relativo
<i>E coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EGFET	Biossensor Potenciométrico com Transistores de Efeito de Campo
EIS	Espectroscopia de Impedância Eletroquímica
ELISA	Ensaio imunoenzimático por enzima ligada
FMB	Febre Maculosa Brasileira
GCE	Eletrodo de Carbono Vítreo
GFM	Grupo Febre Maculosa
GT	Grupo Tifus
HNB	Azul de hidroxinaftol

IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IgY	Imunoglobulina Y
IMP	Imunossensores Impedimétricos
LAMP	Amplificação Isotérmica
LDH	Desidrogenase Láctica
LOD	Limite de Detecção
LOQ	Limite de Quantificação
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
MIF	Microimunofluorescência
MTB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
PBS	Solução Tamponada de Fosfato
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
R. parkeri	<i>Rickettsia parkeri</i>
R. rickettsi	<i>Rickettsia rickettsii</i>
R _{ct}	Resistência à Transferência de Carga
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
SUS	Sistema Único de Saúde
TGO	Transaminase Oxalacética
TGP	Transaminase Pirúvica
ΔR _{ct}	Variação da Resistência à Transferência de Carga

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	19
2.1 ANTICORPO IgG.....	19
2.1.1 Anticorpo IgY.....	21
2.2 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO PARA FMB.....	24
2.3 BIOSSENSORES.....	28
2.3.1 Imunossensores.....	32
2.3.1.1 Imunossensores Impedimétricos.....	34
3 OBJETIVOS.....	38
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
4.1 MATERIAIS.....	39
4.2 PREPARAÇÃO DO IMUNOSSENSOR.....	40
4.2.1 Validação Bioanalítica.....	41
4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	43
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
5.1 DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO IMUNOSSENSOR.....	44
5.1.1 Linearidade.....	47
5.1.2 Seletividade e especificidade.....	49
5.1.3 Acurácia e Precisão.....	50
6 PUBLICAÇÕES.....	53
7 CONCLUSÃO.....	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55

Febre Maculosa Brasileira (FMB) é uma zoonose causada por bactérias da família *Rickettsiaceae* (gênero *Rickettsia*), em especial pela espécie *Rickettsia rickettsii*, bactéria encontrada em animais silvestres como as capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*), podendo ser transmitida para o ser humano através da picada de carrapatos do gênero *Amblyomma*, conhecidos como “carrapato-estrela”, presentes nos animais citados (Donalisio et al., 2020; Evangelista et al., 2021). A doença possui ciclo rápido, se caracterizando por apresentar sintomas muito parecidos com outras doenças nos primeiros dias, mas evoluindo para hemorragias difusas e quadro de sepse pulmonar em poucos dias, razão pela qual o diagnóstico rápido é fundamental para que o tratamento seja realizado antes do 5º dia, sem o qual as chances de recuperação são muito baixas (Brasil, 2019).

De acordo com o boletim epidemiológico do Ministério da Saúde, somente em 2024 foram registrados 381 novos casos da doença no Brasil, com 56 óbitos no mesmo período (Brasil, 2025). Considerando os últimos 10 anos, houve um aumento considerável no número de casos anuais, sendo que a taxa de letalidade tem aumentado ao longo desse período (Brasil, 2025). Isso pode ser explicado pelo aumento do contato das pessoas com animais silvestres que possuem o carrapato-estrela, fator agravado pela destruição dos habitats naturais desses animais pela ocupação humana, causando a migração dos mesmos para áreas urbanas, o que evidencia a correlação das questões ambientais com o avanço de zoonoses como a FMB (Gava, Baga, Langoni, 2022).

O tratamento de escolha utilizado atualmente é o antibiótico doxiciclina, devendo ser administrado o mais rápido possível devido à sua eficácia ser drasticamente reduzida após 4 dias de início dos sintomas, com posologia para 7 dias consecutivos, podendo ser interrompida 2 a 3 dias após a remissão da febre (Muchon et al., 2021). Após o 4º dia, pode haver a chance de agravamento de potenciais complicações a diversos órgãos do corpo (Salviano et al., 2023).

Devido a evidenciada urgência no diagnóstico diferencial, são utilizados testes de imunofluorescência indireta para uma primeira triagem, os quais conseguem detectar o anticorpo IgG anti-*R. rickettsii* e *R. parkeri* nos primeiros dias a depender do

tempo de soroconversão do paciente sem, contudo, fazer distinção dessas espécies num primeiro momento. Em razão disso, é fundamental realizar o exame de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), o qual consegue sequenciar o material genético do patógeno, mas possui a desvantagem de ser mais demorado e mais caro do que o primeiro exame (Pinter et al., 2021).

Nesse contexto, se faz necessário o desenvolvimento de metodologias alternativas para o diagnóstico laboratorial da FMB. Assim, os métodos eletroanalíticos surgem como alternativa para contornar as dificuldades relacionadas com os altos custos laboratoriais, necessidade de estrutura física avançada, pessoal qualificado e a demora na execução desses exames (Ganesh, Kim, 2022). Uma abordagem interessante para a detecção de anticorpos é a imobilização dessas proteínas em um sensor eletroquímico utilizando como método de análise a Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS), uma técnica não-destrutiva que é capaz de monitorar parâmetros como Resistência Elétrica e transferência de cargas elétricas entre o meio reacional e a superfície do eletrodo. Os imunossensores impedimétricos, que se utilizam da EIS para realizar as suas leituras, possuem baixos limites de detecção e quantificação, além de possuírem alta especificidade para o analito em questão, baixo custo e fácil execução em laboratório (Ribeiro, Jorge, 2024).

Portanto, neste trabalho, foi desenvolvido e testado um imunossensor impedimétrico para detecção de anticorpo IgG anti-febre maculosa em amostras de plasma sanguíneo, utilizando como sensor um anticorpo IgY imobilizado na superfície de um eletrodo de carbono vítreo (ECV) utilizando uma solução de ferricianeto de potássio como sonda redox para monitoramento do sistema.

2.1 ANTICORPO IgG

As imunoglobulinas G (IgG) (Figura 1) são uma classe de anticorpos presentes em grande quantidade no plasma sanguíneo humano, sendo relacionadas com a resposta imune adaptativa, mas também com a regulação geral do equilíbrio imunológico. Algumas das funções mais importantes da IgG para o organismo humano são: participação na ativação do sistema complemento, marcação de antígenos para a fagocitose, neutralização de microrganismos e manutenção da imunidade de memória após um processo infeccioso superado (Abbas, 2019; Napodano et al., 2020; Jay et al., 2018).

A figura 1a mostra a estrutura da IgG, onde se observam as regiões Fab (Fragment Antigen Binding) que formam um domínio variável com duas cadeias pesadas e duas cadeias leves, onde cada Fab possui uma cadeia leve e uma pesada, sendo essas cadeias subdivididas em 6 CDR (Região Determinante de Complementariedade). Também se observa a região Fc (Fragment Constant) que formam um domínio constante de uma cadeia com pontes dissulfeto ligando os dois lados da cadeia. A figura 1b apresenta as subclasses de IgG, variando-se a posição das cadeias leves e pesadas, além do número de pontes dissulfeto no domínio constante. Sua importância no diagnóstico laboratorial se dá pela grande variedade de proteínas antigênicas que a IgG é capaz de reconhecer, além de sua persistência no plasma por um período de tempo mais longo, mesmo após a eliminação completa do agente infeccioso (Collins, Jackson, 2013).

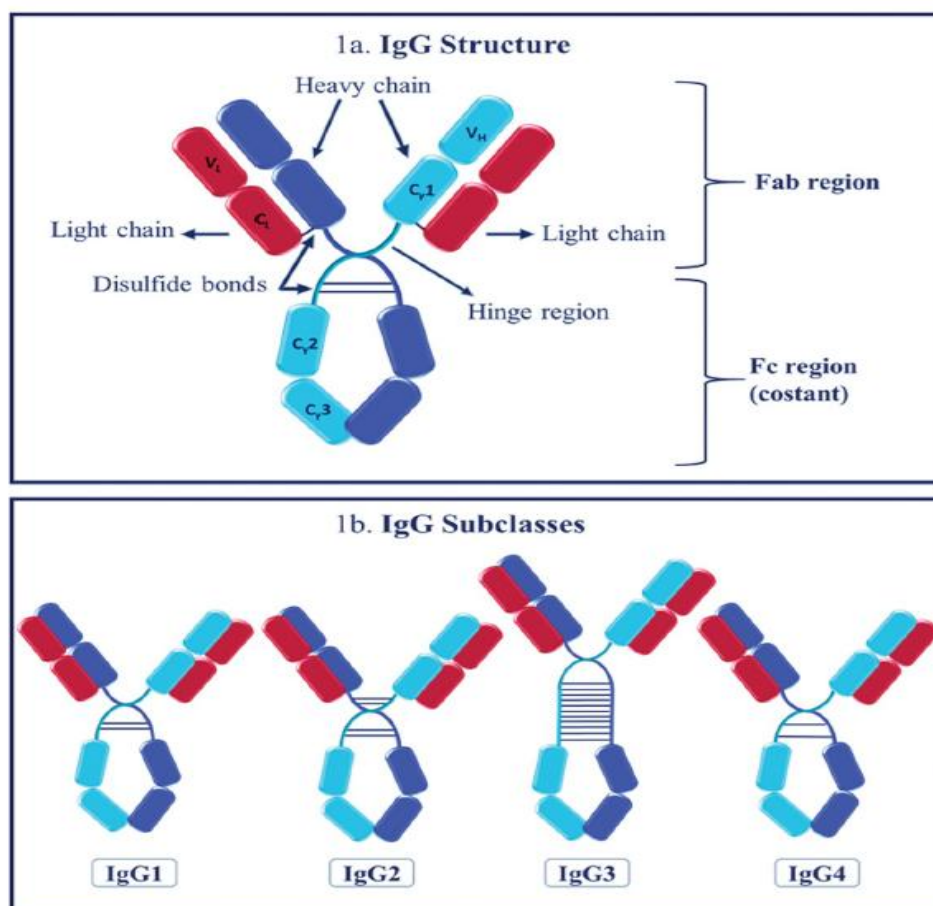


Figura 1: Estrutura do anticorpo IgG (1a.) e suas diferentes classes (1b.).
 Fonte: Napodano et.al. (2020).

Nos casos em que ocorre uma infecção bacteriana, a IgG se liga ao mesmo tempo pela região Fab nos microorganismos e pela região Fc aos neutrófilos e macrófagos, de modo a sinalizar para os fagócitos a necessidade de destruição do antígeno. Em bactérias como a *Rickettsia rickettsii*, que são de ataque intracelular obrigatório, ocorre um movimento de marcação do lipopolissacarídeo (LPS) da membrana externa pelos anticorpos IgM e IgG, sendo este último mais específico para a espécie mencionada nos processos de morte celular programada em questão, o que justifica a utilização dessa imunoglobulina como marcador diagnóstico para FMB em testes de sorologia (Liu, 2015).

A maior parte dos anticorpos utilizados são originados de pequenos mamíferos, principalmente coelhos e ratos. Isto faz com que seu processo de produção seja de

maior custo, exija maior tempo e é mais invasivo do ponto de vista do sofrimento animal. Nesse sentido, é necessário que ocorram as etapas de imunização, coletas de sangue e posterior sacrifício do animal. Além dos desafios mencionados, há casos em que alguns antígenos não apresentam respostas imunes ou provocam respostas imunes fracas (Pereira et al., 2019; Obata et al., 2023).

2.1.1 Anticorpo IgY

A imunoglobulina Y (IgY) é a principal imunoglobulina presente no soro das aves, sendo também identificada em outros grupos de vertebrados, como répteis, anfíbios e peixes pulmonados. Nas aves, três classes de anticorpos são descritas: IgM, IgY e IgA, as quais, durante o processo de oogênese, são transferidas para diferentes compartimentos do ovo. Nesse contexto, a IgY é predominantemente depositada na gema (Pereira et al., 2019; Obata et al., 2023).

Os primeiros estudos baseados na tecnologia IgY surgiram em torno da década de 1980, com o objetivo de aumentar o rendimento da produção de anticorpos, minimizando os custos e sofrimento animal. Dentre as vantagens na utilização de IgY, destaca-se o fato de que não se ligam ao sistema complemento de mamíferos, nem interagem com o receptor para Fc de outras espécies. Isto evita a ocorrência de resultados falso-positivos (Obata et al., 2023).

Do ponto de vista evolutivo, a IgY é considerada um anticorpo ancestral das imunoglobulinas IgG e IgE, encontradas exclusivamente em mamíferos (Figura 2). Em razão de sua distância filogenética em relação aos mamíferos e de sua similaridade funcional com a IgG, a IgY tem despertado grande interesse na área de imunodiagnóstico, destacando-se como uma ferramenta relevante para aplicações biotecnológicas e diagnósticas (Pereira et al., 2019; Obata et al., 2023; Munhoz et al., 2014).

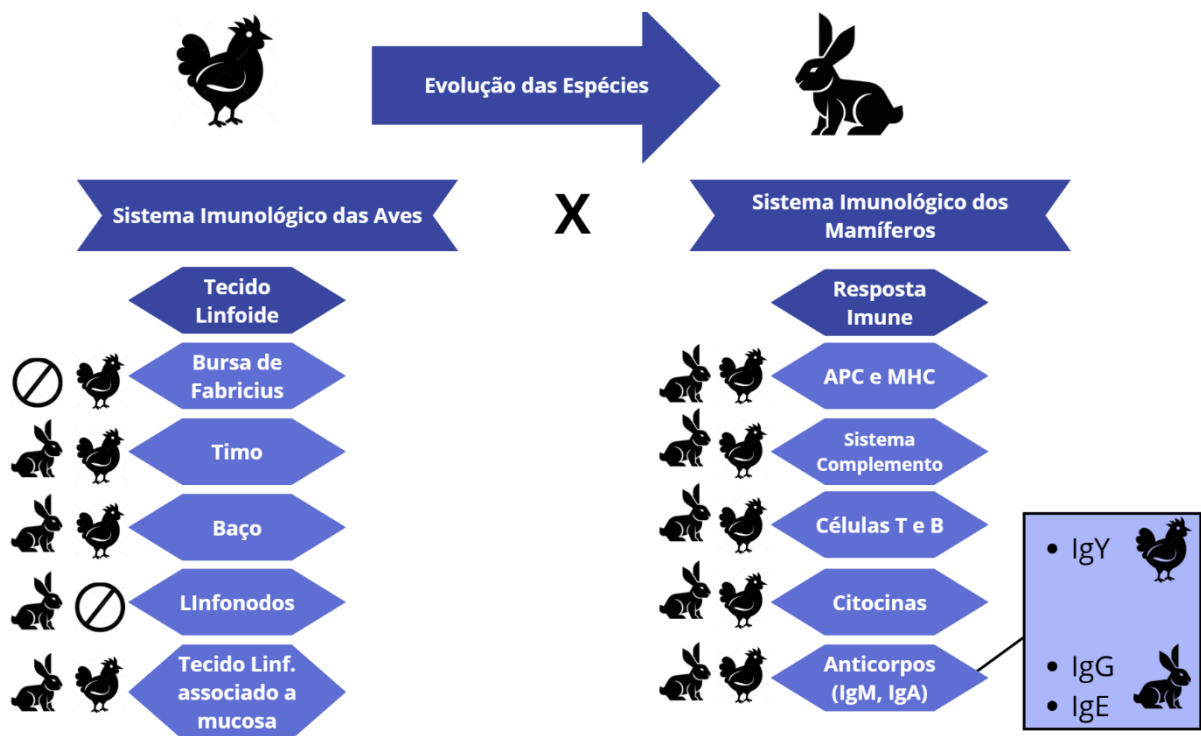


Figura 2: Uma visão geral do tecido linfoide do sistema imunológico das aves em comparação com o dos mamíferos e a posição evolutiva desses animais. APC: células apresentadoras de antígenos; MHC: complexo principal de histocompatibilidade; Ig: imunoglobulina.

Traduzido e adaptado de: Ferreira Júnior, 2018.

A molécula de IgY possui uma estrutura similar à do IgG, com duas cadeias pesadas e duas cadeias leves, o que fez com que em um dado período fosse erroneamente chamado de IgG também. No entanto, Leslie e Clem (1969) destacaram que há diferenças antigênicas e de maior tamanho da cadeia pesada da IgY. Apesar de compartilharem da mesma quantidade de cadeias leves e pesadas, a principal diferença entre o IgG e o IgY é no que diz respeito a quantidade de regiões constantes nas cadeias pesadas de ambas. IgG possui três domínios constantes e IgY quatro domínios constantes (Figura 3) (Pereira et al., 2023).

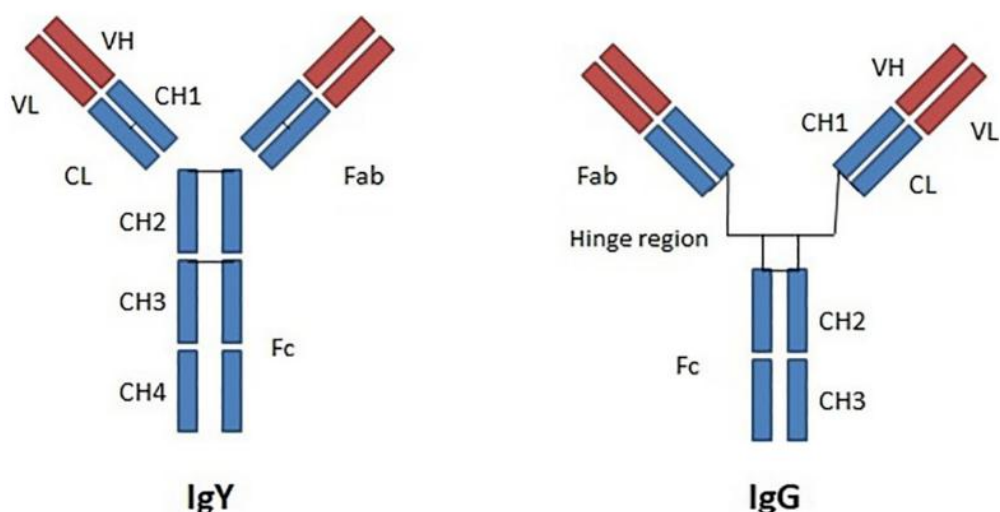


Figura 3: Estrutura de IgY e IgG. V = domínio variável da cadeia leve (VL) e da cadeia pesada (VH); C = domínio constante da cadeia leve (CL) e da cadeia pesada (CH).
 Fonte: Pereira, et al. (2019).

Os anticorpos IgY são de obtenção menos dispendiosa em relação ao IgG de coelhos ou ratos, considerando os procedimentos de obtenção e rendimento das amostras. Galinhas poedeiras produzem em torno de 25 ovos por mês – média de 330 ovos anualmente –, gerando mais de 2 gramas de IgY que podem ser isolados. Isto corresponde aproximadamente aos anticorpos séricos encontrados em 300ml de soro ou 600ml de sangue, quantidade só possível de ser obtida em mamíferos maiores (Munhoz et al., 2014; Obata et al., 2023).

Os anticorpos IgY melhoram a qualidade da interação com os antígenos, o que faz com que sejam promissores para estudar antígenos da saliva de ixodídeos de interesse médico e veterinário, como por exemplo o *Amblyomma cajennense*, que é vetor de patógenos humanos e animais tais como as riquétisias causadoras de Febre Maculosa. Nesse sentido, foi observado que a saliva do carrapato foi imunogênica para as galinhas, o que induziu a produção de anticorpos IgY de alta avidéz e elevada titulação (Obata et al., 2023).

2.2 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO PARA FMB

Historicamente, o cenário do diagnóstico para as infecções provocadas por riquetsias tem tido como principal base as sorologias. Nesse sentido, destaca-se o desenvolvimento do teste de Weil-Felix em 1916. Este teste utiliza uma metodologia baseada na reatividade cruzada entre riquetsias e vários sorotipos de *Proteus* (anticorpo Ab antígeno Ag-TG de *P. vulgaris* OX-19, anticorpo AG-SFG de *P. vulgaris* OX-2 e OX-19) (CRUICKSHANK, 1927). Como limitações, este teste apresenta baixa sensibilidade e especificidade para todos os grupos de riquetsias, sendo assim não utilizado ou raramente utilizado (Stewart, Stewart, 2021).

Considerando o contexto brasileiro, é necessário mencionar os métodos diagnósticos preconizados pelo Sistema Único de Saúde (SUS), que são divididos em dois tipos: exames específicos e inespecíficos. Dentre os exames específicos, o método mais utilizado é a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), considerada padrão ouro (Figura 4). A RIFI é realizada com os anticorpos IgG que aparecem após a detecção dos anticorpos IgM e aumentam em título no soro do paciente de acordo com o avanço da doença. Outras opções que são preconizadas pelo SUS, mas para a pesquisa direta da riquetsia são a imuno-histoquímica; as técnicas de biologia molecular como a PCR e o isolamento em cultura (Ministério da Saúde, 2019). Dentre os exames inespecíficos são mencionados o hemograma, para identificar anemia e plaquetopenia cujos dados podem corroborar para o diagnóstico; e ensaios enzimáticos baseados na Creatinoquinase (CK), desidrogenase láctica (LDH), aminotransferases (TGP e TGO) e bilirrubinas (BT). As respostas para estas enzimas podem parecer aumentadas nos exames. O grande desafio ao se tratar da FMB é o diagnóstico diferencial precoce, sobretudo nos primeiros dias de infecção (Ministério da Saúde, 2019).

Além do desafio citado anteriormente, há outros pontos a serem considerados no diagnóstico da FMB. A RIFI, apesar de ser o padrão ouro preconizado pelo SUS, apresenta algumas limitações que dificultam o acesso a esse diagnóstico. Algumas das limitações a serem mencionadas são: o número restrito de espécies de riquetsias incluídas nos testes comercializados, o que pode dificultar um diagnóstico específico; a reatividade cruzada entre as riquetsias do grupo da FMB, o que facilita o diagnóstico a nível de grupo, mas dificulta o diagnóstico preciso da espécie infectante; reatividade cruzada entre os grupos GFM (Grupo Febre Maculosa) e GT (Grupo Tifus); o diagnóstico a nível de espécie fica restrito a centros diagnósticos mais especializados, pela demanda de testes mais específicos e sofisticados; a subjetividade na leitura dos títulos, que pode variar de acordo com o operador. Por isso sugere-se que seja feita pelo mesmo operador e existe a necessidade de infraestrutura e equipamentos específicos e de alto custo, além da expertise do profissional para realizar a interpretação adequadamente (Alcon-Chino, De-Simone, 2022; Stewart, Stewart, 2021).

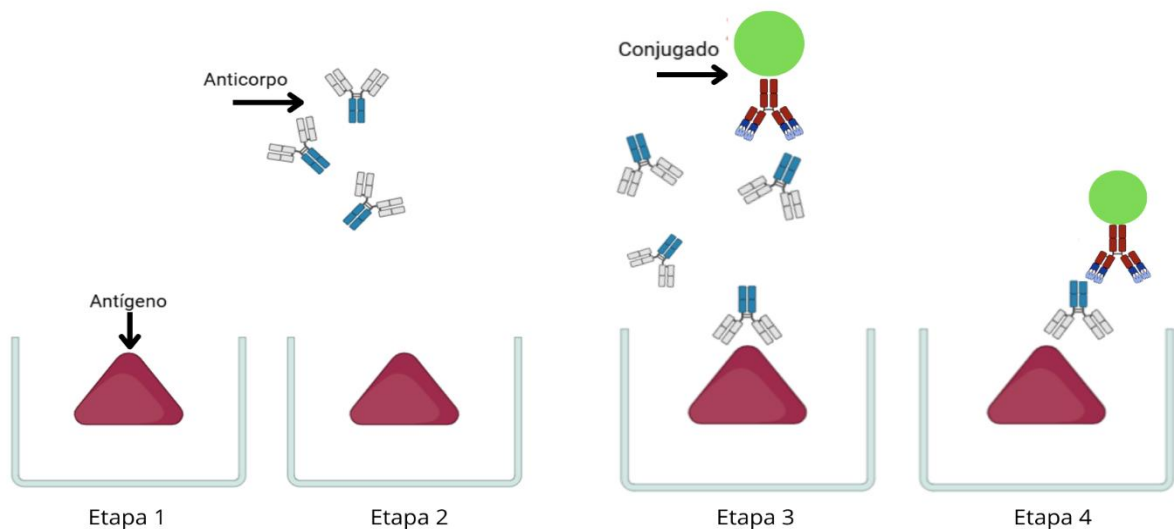


Figura 4: Esquema do mecanismo do teste de Imunofluorescência Indireta.

Fonte: Elaboração própria (2025).

Paralelamente, é observada a utilização da PCR para a detecção de riquetsias. A PCR permite a identificação rápida do DNA de *Rickettsias* sem a necessidade de testes múltiplos em diferentes amostras e demonstra ter alta eficácia e sensibilidade (Figura 5). No entanto, como o DNA de *Rickettsia* é de quantidade limitada e de curta

duração na infecção aguda, a sensibilidade clínica do ensaio é considerada subótima. A sensibilidade da PCR para *Rickettsia* é muito superior em amostras de tecido do que em amostras de sangue, o que ocorre em razão de que a maioria das espécies de *Rickettsia* infectam as células endoteliais e não as células sanguíneas circulantes. Desse modo, a presença de resultados muito aumentados da presença do DNA de *Rickettsia* no sangue estão relacionados a desfechos fatais (Marques et al., 2024; Stewart, Stewart, 2021).

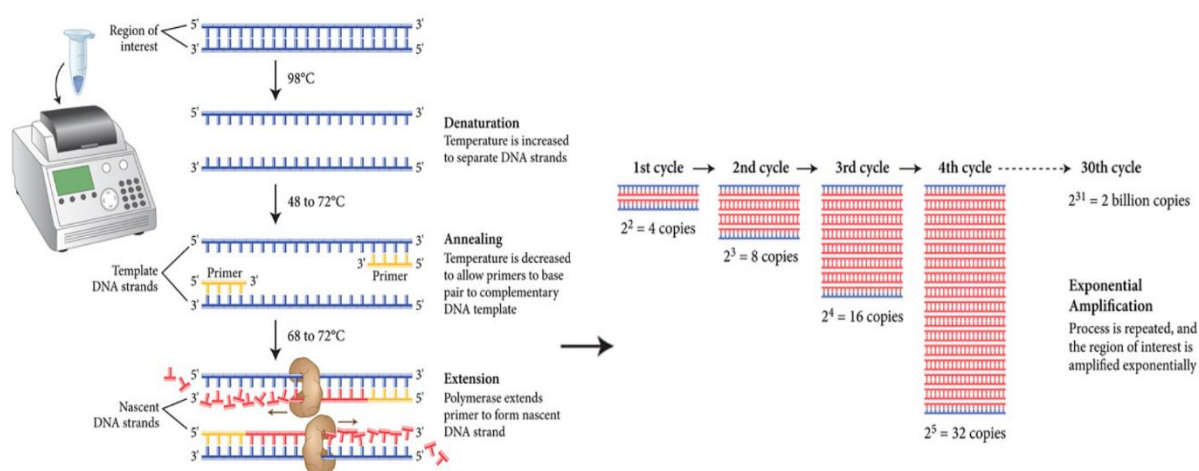


Figura 5: Esquema das etapas de amplificação da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR).
Fonte: Heringer, Siratuti, 2014 (online).

Outras técnicas desenvolvidas, embora ainda restritas ao campo da pesquisa ou utilizadas de forma paralela aos métodos padrão-ouro, incluem: microimunofluorescência (MIF), ensaios de *Western Blott* e adsorção cruzada, ensaio imunoenzimático (ELISA) para IgM ou IgG (Stewart, Stewart, 2021); e o método LAMP (Amplificação Isotérmica Mediada por *Loop*) (Quadro 1). O método LAMP foi recentemente desenvolvido com o objetivo de minimizar as dificuldades do diagnóstico em regiões cuja infraestrutura é limitada. Este teste utiliza o azul de hidroxinaftol (HNB) como indicador da formação de pirofosfato de magnésio, um marcador da presença de DNA. Os resultados do teste são obtidos em tempo menor que a PCR e não requer equipamentos rebuscados, como o termociclador, possui alta

sensibilidade e boa reprodutibilidade. Por outro lado, também apresenta limitações quanto a especificidade, que é limitada em humanos, quanto a interpretação subjetiva dos corantes e ainda possui validação limitada (Carvajal-Gamez et al., 2024).

Quadro 1: Comparação entre testes utilizados em pesquisa para detecção de Febre Maculosa.

Método	Vantagens	Lacunhas/Limitações
Microimunofluorescência (MIF)	<ul style="list-style-type: none"> - Detecta múltiplos antígenos riquetsiais simultaneamente; - Pode sugerir o agente causador com base na titulação. 	<ul style="list-style-type: none"> - Possíveis reações cruzadas; - Não é definitiva para identificação de espécie.
Western Blotting	<ul style="list-style-type: none"> - Detecta LPS e antígenos protéicos específicos da espécie; - Permite diagnóstico em nível de espécie. 	<ul style="list-style-type: none"> - Alto custo; - Exige conhecimento técnico especializado; - Restrito a laboratórios de referência.
Ensaio Adsorção Cruzada	<ul style="list-style-type: none"> - Alta especificidade; - Confirma espécie causadora ao remover anticorpos heterólogos e homólogos. 	<ul style="list-style-type: none"> - Técnica complexa e cara; - Requer laboratório especializado.
ELISA (IgM ou IgG)	<ul style="list-style-type: none"> - Alta sensibilidade e especificidade; - Viável para ambientes com poucos recursos; - Testes em lote; - Menor necessidade de expertise técnica. 	<ul style="list-style-type: none"> - Resultados normalmente qualitativos; - Pontos de corte (OD \geq 0,5) carecem de validação independente.
ELISA Quantitativo	<ul style="list-style-type: none"> - Elimina pontos de corte arbitrários; - Relata resultados em títulos com base em controles negativos; - Interpretação mais objetiva. 	<ul style="list-style-type: none"> - Ainda em desenvolvimento; - Validação independente ainda limitada.
LAMP (Amplificação Isotérmica)	<ul style="list-style-type: none"> - Rápido e simples; - Não requer termociclador; - Alta sensibilidade; - Boa reprodutibilidade; - Ideal para locais com baixa infraestrutura. 	<ul style="list-style-type: none"> - Baixa especificidade em humanos; - Interpretação subjetiva dos corantes; - Validação ainda limitada.

Fonte: Elaboração própria com dados obtidos a parti de Stewart, Stweart, 2021; Carvajal-Gamez et al., 2024.

2.3 BIOSSENSORES

Os biossensores eletroquímicos são dispositivos analíticos que contém, frequentemente, eletrodos modificados, combinando um componente biológico integrado com um detector físico-químico em sua estrutura. São considerados um dos métodos de detecção mais populares para detectar diversos tipos de doenças, por sua portabilidade, baixo custo e curto tempo de detecção (Wang et al., 2021; Salomão, 2018).

Partindo do histórico desses dispositivos, é importante mencionar a importância de Clark e Lyons nesse cenário, sendo considerados os pais dos biossensores. O pioneirismo desses pesquisadores deve-se ao desenvolvimento do primeiro biossensor amperométrico em 1962, um sensor enzimático para detectar a glicose no sangue. Alguns anos após, Guilbault e Montalvo construíram o primeiro biossensor potenciométrico para ureia e a partir de então novos biossensores foram sendo desenvolvidos ao longo dos anos (Fatibello Filho, Capelato, 1991). Nesse contexto, os biossensores destacaram-se como ferramentas mais acessíveis economicamente e com rapidez de resultados para fins de análises químicas, ambientais e farmacêuticas (Bahadir et al., 2014).

Na atualidade, os biossensores destacam-se nos estudos que focam no diagnóstico no local de atendimento devido suas vantagens de custo, sensibilidade e uso. Nesse sentido, foram desenvolvidos diversos tipos de biossensores voltados para o diagnóstico de doenças infecciosas. Dentre os sensores mais amplamente utilizados estão os voltamétricos e amperométricos, destacando-se o desenvolvimento de um sensor voltamétrico com nanofolhas de MoS₂ adsorvidas em eletrodos de ouro para detecção POC de DNA do vírus Chikungunya e de um biossensor amperométrico por imunensaio de microponta para detectar *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) em escarro humano. Um biossensor potenciométrico com transistores de efeito de campo de porta estendida (EGFET) em chip duplo foi desenvolvido para detecção do vírus do herpes bovino-1 (BHV-1) (Wang et al., 2021).

Nos últimos anos, ocorreu também o desenvolvimento de imunossensores e biossensores baseados em FET voltadas ao diagnóstico de doenças infecciosas no local de atendimento. Um imunossensor impedimétrico sem rótulo com anticorpo anti-NS1 imobilizado em eletrodo de ouro foi desenvolvido para o diagnóstico de dengue além de um nanobiossensor FET de grafeno funcionalizado com anticorpos scFv para detecção multiplexada de antígenos da *Borrelia burgdorferi* (doença de Lyme). A possibilidade de miniaturização e evolução da microfluídica fez com que esses métodos ganhassem destaque e melhorassem sua eficiência nos contextos de diagnóstico no local de atendimento (Wang et al., 2021).

Os biossensores eletroquímicos podem ser classificados de acordo com o tipo de sinal (transdução) e de acordo com a natureza do agente a ser imobilizado. De acordo com o tipo de transdutor, os principais biossensores são: amperométrico, potenciométrico, voltamétrico, impedimétrico, condutométrico e FET (Transistor de Efeito de Campo) (Baracu, Gugoasa, 2021; Khanmohammadi, et al., 2020; Félix, Agnes, 2018). Esses tipos de biossensor são descritos no Quadro 2:

Quadro 2: Tipos de Biossensor de acordo com o tipo de sinal.

Tipo de Biossensor	Tipo de sinal	Características principais	Aplicações
Amperométrico	Corrente elétrica (intensidade)	- Reações redox - Sistema de três eletrodos - Potencial constante ou varredura de tempo	Medição de glicose no sangue, detecção de peróxido de hidrogênio.
Potenciométrico	Potencial elétrico	- Sem corrente significativa - Baseado em equilíbrio eletroquímico - Sensor íon-seletivo	pH-metros, sensores para Na ⁺ , K ⁺ , Ca ²⁺
Voltamétrico	Variação de corrente elétrica, mediante a aplicação de um potencial	- Seletividade - Análise qualitativa e quantitativa	Mensuração de reações de redução para algumas classes químicas.
Impedimétrico	Impedância (resistência + reatância)	- Usa corrente alternada - Sensível à interface eletrodo/solução	Detecção de bactérias, células tumorais, biomarcadores

Condutométrico	Condutividade elétrica	- Variação na concentração de íons - Simples e de baixo custo	Monitoramento de qualidade da água, sensores de íons
FET (Transistor de Efeito de Campo)	Corrente modulada por potencial	- Alta sensibilidade - Integração em chips - Eletrodo de comporta sensível	Biossensores de DNA, sensores enzimáticos, sensores de íons

Fonte: Elaboração própria com dados obtidos a partir de Baracu, Guogasa, 2021; Khanmohammadi, et al., 2020; Félix, Agnes, 2018.

O mecanismo de funcionamento de um biossensor consiste em algumas etapas básicas, como, o reconhecimento biológico, a interação com o analito, a transdução do sinal e a fase de leitura e processamento. Na primeira etapa, um elemento biológico é imobilizado no sensor, sendo que este elemento deve ter afinidade específica pelo analito (substância-alvo) e é responsável por reconhecê-lo e ligar-se a ele. Na segunda etapa, quando o analito entra em contato com o biossensor, ocorre a interação com o elemento de reconhecimento e essa interação provoca alterações em propriedades físico-químicas do sistema. Durante a etapa de transdução do sinal, um transdutor (eletrodo) irá detectar as alterações provocadas e converter a mudança física ou química em um sinal mensurável (elétrico, óptico etc.). Por fim, o sinal é amplificado e processado para fornecer uma leitura quantitativa ou qualitativa da presença do analito (Figura 6) (Pejcic, 2006).

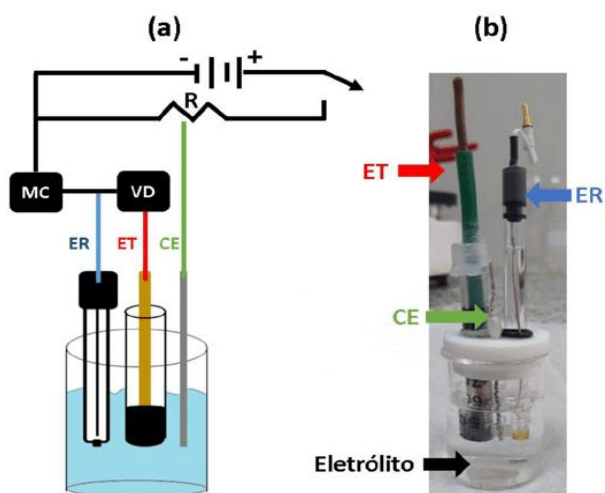


Figura 6: Imagem de uma célula eletroquímica de 3 eletrodos. ER: Eletrodo de Referência; ET: Eletrodo de Trabalho; CE: Contra-eleto.

Fonte: Monteiro; Santos Júnior; Sussuchi (2020).

As aplicações dos biossensores são variáveis e vão desde o diagnóstico clínico até o monitoramento ambiental e áreas como o controle de qualidade, agricultura, controle de bioprocessos e indústria alimentícia (Kim, Park, 2021; Félix, Agnes, 2018).

Dentre as vantagens mencionadas na literatura sobre os biossensores destacam-se a portabilidade, simplicidade, facilidade de uso, custo-benefício e o fato de que, em muitos casos, são dispositivos descartáveis. Para além destes benefícios, os biossensores são eficientes em amostras complexas, são uma alternativa viável para os sistemas bioanalíticos avançados e, quando associados a Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS), possuem a capacidade de investigar propriedades elétricas de massa e interfaciais (Khanmohammadi et al., 2020; Bahadir et al., 2014). A falta de eletrodos adequados e de detecção única são algumas das limitações encontradas nos biossensores, e podem ser superadas diante da incorporação de nanopartículas e biomarcadores de interesse para aumentar os limites de detecção (Agrahari et al., 2022). Wang et al. (2021) ressaltam também algumas limitações dos biossensores eletroquímicos quando comparados a outros tipos de biossensores, como baixa estabilidade e suscetibilidade à interferência.

Como citado anteriormente, os biossensores têm diferentes classificações a depender do tipo de sinal e de acordo com a natureza do agente a ser imobilizado. Quanto ao agente de reconhecimento, os biossensores podem ser classificados em: imunossensores, aptassensores, biossensores enzimáticos e genossensores (Quadro 3) (Khanmohammadi et al., 2020).

Quadro 3: Tipos de Biossensor de acordo com a natureza do agente a ser imobilizado.

Tipo de Biossensor	Agente de reconhecimento	Características principais	Aplicações	Tipo de transdutor
Imunossensor	Anticorpos	Alta especificidade por antígenos	Diagnóstico de doenças, testes rápidos, detecção de vírus	Eletroquímica, óptica
Aptassensor	Aptâmeros (DNA/RNA sintético)	Alta afinidade e seletividade, estabilidade, fácil modificação química	Detecção de pequenas moléculas, proteínas, íons	Eletroquímica, óptica, etc

Biossensor enzimático	Enzimas	Especificidade catalítica, reações rápidas	Monitoramento de glicose, colesterol, lactato	Eletroquímica, Óptica
Genossensor	DNA ou RNA complementar	Reconhecimento por hibridização (pareamento de bases)	Diagnóstico molecular, detecção de mutações, patógenos	Eletroquímica, óptica

Fonte: Elaboração própria com dados obtidos a partir de Khanmohammadi et al., 2020.

2.3.1 Imunossensores

Os imunossensores eletroquímicos são a classe de dispositivos biossensores que possui maior afinidade para a detecção de proteínas. O mecanismo de funcionamento é similar a de outros biossensores, diferenciando-se somente quanto a natureza do agente biológico de mensuração (antígeno) que é reconhecido por meio de um anticorpo de captura. O sinal de reconhecimento gerado nos imunossensores eletroquímicos é um sinal elétrico (corrente, voltagem, resistência etc.) (Yang, Lu, Liu, 2022; Karachaliou, Livaniou, 2023).

A classificação dos tipos de imunossensor é feita com base no tipo de sinal elétrico convertido pelo transdutor, podendo ser: amperométricos, potenciométricos, condutométricos, impedimétricos ou capacitivos. Nos imunossensores amperométricos ocorre a detecção de corrente elétrica; nos potenciométricos como acúmulo ou potencial de carga; nos condutométricos/impedimétricos ocorre por meio de alteração na condutividade. De acordo com a estrutura, eles podem ser classificados como imunossensores marcados ou não-marcados. Nos imunossensores marcados é necessário que haja um marcador eletroativo adequado, que pode ser uma enzima, nanopartículas, etc. Este marcador é conjugado ao anticorpo de detecção. Por outro lado, nos imunossensores não-marcados a detecção do analito ocorre por meio da alteração no sinal de impedância eletroquímica provocada pela ligação antígeno-anticorpo, sem a necessidade da conjugação de um marcador. Isto promove a redução de custos na elaboração dessa classe de imunossensor (Janik-Karpinska et al., 2022; Karachaliou, Livaniou, 2023).

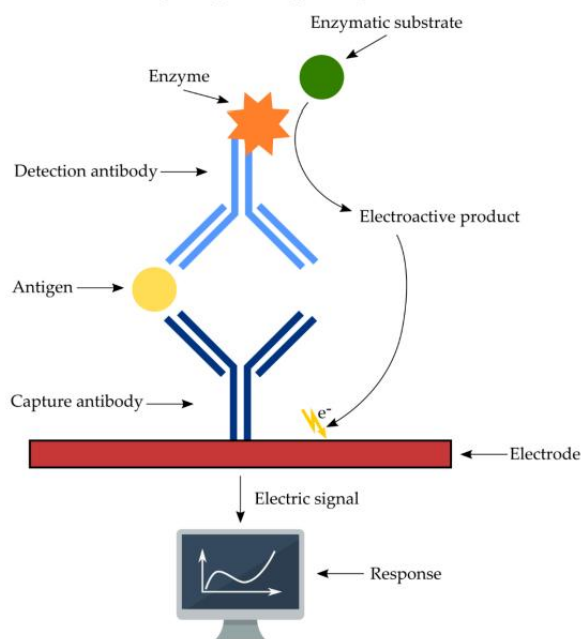


Figura 7: Esquema de funcionamento de um Imunossensor eletroquímico com marcação.
 Fonte: Janik-Karpinska et al., 2022.

Os imunossensores têm sido amplamente utilizados para a detecção de microorganismos e toxinas patogênicas, bem como para doenças infecciosas que dependem de diagnóstico rápido. Nesse sentido, os imunossensores favorecem a realização de testes no local de atendimento e facilitam o acesso ao diagnóstico em contexto com menores recursos materiais. Imunossensores eletroquímicos de DNA que incorporam AuNPs (nanopartículas de ouro) são relevantes em aplicações clínicas, por possuir detecção altamente sensível e seletiva de sequências de DNA e biomarcadores de câncer (Siciliano, et al., 2024). Wan et al. (2016) desenvolveram um imunossensor impedimétrico para a detecção de *E. coli*, baseado em monocamada automontável de nanopartículas de ouro com anticorpos imobilizados. No contexto de diagnósticos virais, foi desenvolvido um imunossensor não-marcado para diferenciar subtipos de influenza A (H1N1, H3N2, H1N1/2009) baseado em aptâmeros de DNA contra mini-hemaglutinina recombinante (De Lima et al., 2023). Destaca-se a importância dos imunossensores no período pandêmico, contexto em que houve o desenvolvimento de inúmeros dispositivos para tentar realizar a detecção de forma mais rápida e barata. No estudo de Mehmandoust et al. (2022), foi desenvolvida uma nova abordagem de biossensor para detecção da proteína S do Sars-CoV-2 em amostras nasais.

As vantagens na utilização dos imunossensores consistem na combinação da análise eletroquímica com a reação antígeno-anticorpo, que proporciona alta especificidade e sensibilidade, além de simplicidade, operacionalidade e baixo custo. Como já mencionado anteriormente, esse tipo de sensor favorece a análise de amostras de pacientes no ponto de atendimento quando comparada a outras técnicas analíticas convencionais. Outras vantagens são: a facilidade de produção de eletrodos em larga escala, boa compatibilidade com leitores elétricos e miniaturização (Yang, Lu, Liu, 2022; Karachaliou, Livaniou, 2023). Enquanto limitação dos imunossensores percebe-se a alteração da atividade de ligação dos anticorpos que ocorre em razão da necessidade de ligar e bloquear grupos funcionais durante a imobilização covalente. Além do mais, a imobilização da região Fab (região de ligação ao antígeno) pode interferir no parátopo e reduzir a capacidade de reconhecimento do antígeno. Essas limitações podem ser amenizadas utilizando estratégias de ligação via região Fc dos anticorpos, melhorando a orientação e funcionalidade dos anticorpos sobre a superfície sensora e aumentando a eficiência do reconhecimento (Kim, Park, 2021).

2.3.1.1 Imunossensores Impedimétricos

Antes de adentrar nos imunossensores impedimétricos (IMP), é necessário situar a EIS no contexto dos imunossensores e sua importância. A EIS é uma técnica que mede o nível de dificuldade que um sinal elétrico encontra ao percorrer um circuito, sendo uma combinação de elementos de um circuito elétrico: resistência, capacitância e indutância. Em geral, a impedância é expressa como um número complexo que consiste em um componente real (resistência ôhmica) e um componente imaginário (reatância capacitiva). A vantagem de um IMP em comparação aos voltamétricos ou amperométricos é não haver a necessidade de marcação, podendo detectar a ligação de um analito sem geração de sinal adicional ou moléculas amplificadoras (Kim, Park, 2021; Ribeiro et al., 2015).

Os IMP são uma classe de biossensor que utiliza o sinal elétrico, valendo-se da alteração na condutividade do sistema, a técnica de leitura utilizada é a EIS, que é amplamente utilizada em diferentes aplicações como, diagnóstico clínico, análises ambientais e de alimentos (Karachaliou, Livaniou, 2023; Kim, Park, 2021). O IMP não

necessita de marcação, pois o seu mecanismo de detecção do analito ocorre por meio da alteração no sinal de impedância eletroquímica causada pela ligação antígeno-anticorpo. A EIS aplica um sinal de perturbação de pequena amplitude a um eletrodo inserido num eletrólito, gerando uma resposta em função cossenoidal no domínio do tempo, que depois é convertida para o domínio da frequência, onde é possível mensurar a resistência elétrica do eletrodo, da solução e da dupla camada elétrica formada entre os dois (Elemento de Fase Constante), além da influência do transporte de massa (Impedância de Warburg). O sinal impedimétrico baseia-se na alteração de um desses parâmetros do circuito elétrico após a ligação do analito (Yang, Lu, Liu, 2022; Janik-Karpinska et al., 2022).

Dada a versatilidade e baixo custo dos IMP, há estudos voltados para o uso destes na identificação de patógenos como *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, dengue, Enterotoxina estafilocócica B e Ricina (Janik-Karpinska et al., 2022). Isto evidencia as diferentes naturezas de patógenos (virais, bacterianos etc) que podem ser identificados por IMP.

No Quadro 4, a seguir, estão relacionados alguns estudos voltados para o desenvolvimento de IMP entre 2020 e 2025 e suas respectivas aplicações e técnicas utilizadas:

Quadro 4: Aplicações de Imunossensores impedimétricos dos últimos cinco anos (2020-2025).

Título do artigo/Autor (ano)	Tipo de Imunossensor	Marcador alvo	Técnica utilizada
<i>“Impedimetric Immunosensor for OnSite Measurement of Rituximab from Invasive and Non-Invasive Samples”.</i> (Rodrigues, et al., 2022).	Impedimétrico	Rituximabe	Espectroscopia de impedância e voltametria cíclica
<i>“A Label-Free Electrochemical Impedimetric Immunosensor</i>	Impedimétrico	SARS-CoV-2	Espectroscopia de impedância

<i>with Biotinylated-Antibody for SARS-CoV-2 Nucleoprotein Detection in Saliva</i> ". (WU, CHIANG, CHIANG, 2022).			
<i>"Rapid and accurate detection of herpes simplex virus type 2 using a low-cost electrochemical biosensor"</i> (De Lima et al., 2023).	Impedimétrico	glicoproteínas gD2 do HSV-2 (vírus Herpes Simples tipo 2)	Espectroscopia de impedância
<i>"Impedimetric biosensor for bovine herpesvirus Type 1-antigen detection"</i> . (Garcia et al., 2020).	Impedimétrico	Herpes bovino tipo 1	Espectroscopia de impedância e voltametria cíclica
<i>"A wearable microfluidics-integrated impedimetric immunosensor based on Ti3C2Tx MXene incorporated laserburned graphene for noninvasive sweat cortisol detection"</i> . (Nah et al., 2021).	Impedimétrico	Cortisol	Espectroscopia de impedância e voltametria cíclica
<i>"Rapid detection and quantification of microcystins in surface water by an impedimetric immunosensor"</i> . (Ogungbile et al., 2021).	Impedimétrico	Microcistinas	Espectroscopia de impedância
<i>"Impedimetric immunosensor for rapid and simultaneous detection of chagas and visceral leishmaniasis for point of care diagnosis"</i> . (Cordeiro et al., 2020).	Impedimétrico	Chagas e leishmania visceral	Espectroscopia de impedância e voltametria cíclica

<p><i>"Screen Printed Based Impedimetric Immunosensor for Rapid Detection of Escherichia coli in Drinking Water".</i> (Cimafonte et al., 2020).</p>	<p>Impedimétrico</p>	<p><i>Escherichia coli</i></p>	<p>Espectroscopia de impedância e voltametria cíclica</p>
<p><i>"Electrochemical Immunosensor for the Early Detection of Rheumatoid Arthritis Biomarker: Anti-Cyclic Citrullinated Peptide Antibody in Human Serum Based on Avidin-Biotin System"</i> (Chinnadayala, Cho, 2020).</p>	<p>Impedimétrico</p>	<p>Anticorpo anti-peptídeo citrulinado cíclico (ACPAs) em soro humano</p>	<p>Espectroscopia de impedância</p>
<p><i>"Nanoimmunosensor for the electrochemical detection of oncostatin M receptor and monoclonal autoantibodies in systemic sclerosis"</i> (Avelino, et al. 2023).</p>	<p>Impedimétrico</p>	<p>Receptor de oncostatina M e autoanticorpos monoclonais na esclerose sistêmica</p>	<p>Espectroscopia de impedância e voltametria cíclica</p>

Fonte: Elaboração Própria

Obter um imunossensor impedimétrico sem marcação baseado em imobilização de anticorpo IgY para detecção de IgG anti-Febre Maculosa Brasileira em amostras de plasma sanguíneo de capivara.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Desenvolver um imunossensor impedimétrico sem marcação a partir da modificação da superfície de um Eletrodo de Carbono Vítreo por imobilização do anticorpo IgY, utilizando a técnica de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS) para monitoramento;

Testar o imunossensor utilizando amostras de plasma sanguíneo de capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) contendo anticorpos IgG anti *Rickettsia rickettsii*, bactéria causadora da Febre Maculosa Brasileira (FMB);

Realizar a validação bioanalítica do imunossensor desenvolvido a fim de comprovar a sua seletividade, linearidade, precisão e exatidão, de modo que o método consiga ser utilizado para fins de diagnóstico laboratorial.

4.1 MATERIAIS

Todos os reagentes foram de grau analítico e foram utilizados diretamente nos experimentos, sem purificação adicional, sendo as soluções aquosas diluídas em água ultrapura. Caseína de leite bovino (CAS) de grau analítico foi adquirida da Sigma Aldrich Co (St. Louis, MO, EUA) e diluída em tampão borato a 0,5%, pH 9,0. Ferricianeto de potássio ($\text{Fe}(\text{CN})_6$) e Cloreto de Potássio (KCl) foram adquiridos da Vetec Química Fina Ltda (Rio de Janeiro, Brasil), com a qual uma solução de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 0,01 M foi preparada e utilizada como sonda redox em todas as leituras. Fosfato de sódio monobásico e dibásico foram utilizados para preparar uma solução salina tamponada (PBS (100 mM, pH 7)) com uma proporção das duas soluções denominadas A e B, respectivamente, com ajuste de pH em um potenciômetro. Os agentes biológicos IgY e IgG foram obtidos no laboratório Sorolab, da Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ) na Universidade Federal de Goiás (UFG).

Os anticorpos IgG de capivara foram obtidos do plasma sanguíneo com uma solução de sulfato de amônio altamente concentrada, agitada suavemente e centrifugada a 4 °C. A fração enriquecida com anticorpos foi dialisada contra uma solução salina tamponada com fosfato (PBS) 0,1 M. A proteína foi quantificada pelo método de Bradford. As imunoglobulinas Y foram produzidas utilizando a metodologia de Ferreira Junior et al. (2012), na qual galinhas poedeiras brancas foram inoculadas três vezes em um intervalo de duas semanas com 100 µg de anticorpos de capivara emulsionados em adjuvantes de Freund, totalizando 500 µl de inóculo. A IgY policlonal foi obtida da gema de ovo de galinha por dois métodos distintos. Primeiramente, a gema do ovo foi tratada com água destilada acidificada (pH 5,0) para remover compostos lipídicos altamente concentrados, armazenando-a a -20 °C e, em seguida, centrifugada a 10.000 xg por 30 minutos a 4 °C. Depois, o sobrenadante foi diluído com sulfato de sódio em pó a 19% (p/v), sob agitação cuidadosa por 2 horas à temperatura ambiente. Esta solução foi centrifugada a 10.000 xg por 30 minutos a 4 °C. O sedimento foi dialisado em PBS 0,1 M e armazenado a -20 °C. A proteína foi quantificada pelo método de Bradford. Todas as soluções para o ensaio de anticorpos

foram preparadas com solução salina tamponada em fosfato (PBS) (0,1M, pH 7) (Figura 8).

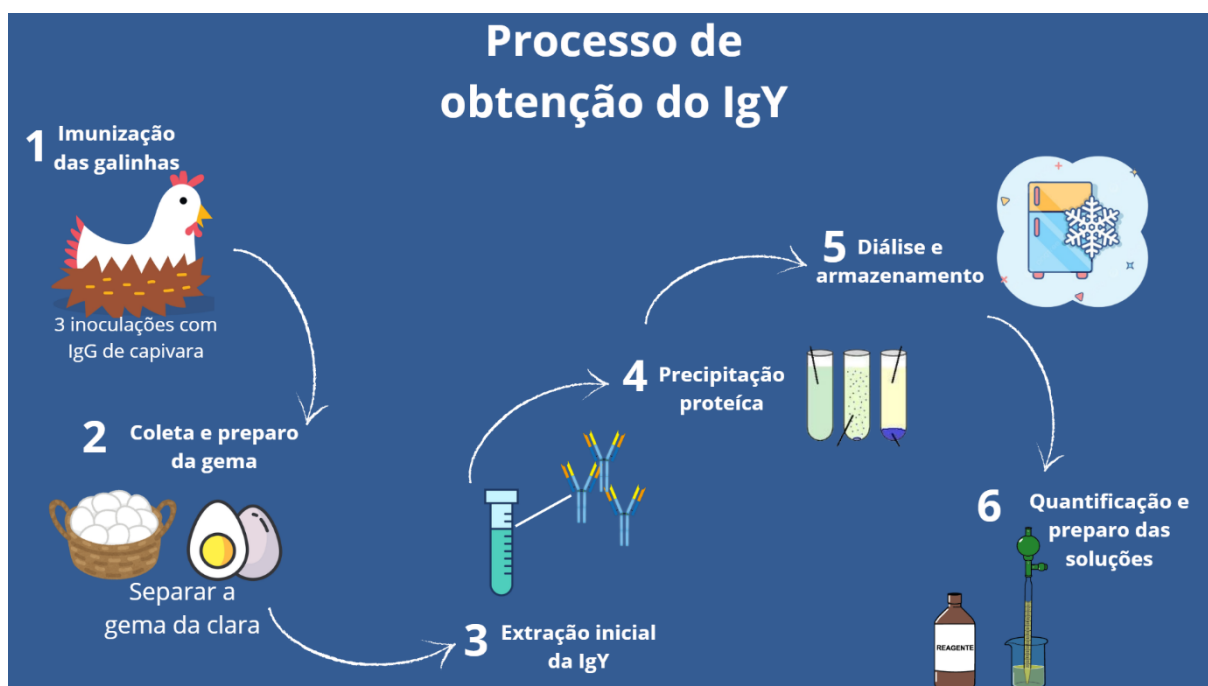


Figura 8: Processo de obtenção do anticorpo IgY.

Fonte: Elaboração própria a partir de Ferreira Júnior (2012).

4.2 PREPARAÇÃO DO IMUNOSENSOR

Todo o processo de funcionalização do imunossensor é ilustrado na figura 9. O eletrodo de carbono vítreo foi ativado por cronoamperometria a um potencial constante de 1,2 V por 10 minutos em 100 mM de PBS (pH 7,0). Para a imobilização dos Anticorpos (Ac), o GCE ativado (AGCE) foi recoberto com 10 mL de suspensão de Ac IgY a 1 mg mL^{-1} pelo método de *drop casting*. O eletrodo resultante, aqui denominado AGCE/Ab, foi então seco em estufa à 35°C e imerso em Caseína (0,5%) (CAS) por 5 min para bloquear as partes não ligadas restantes do eletrodo. Posteriormente, o eletrodo preparado, definido como AGCE/AbCAS, foi enxaguado abundantemente com 5 mL de água ultrapura para remover o CAS não ligado e qualquer excesso de Ac fisicamente adsorvido na superfície do eletrodo. Após a construção do imunossensor, ele foi armazenado em temperatura de geladeira (entre 2 e 8 °C) antes da realização da medição do ensaio.

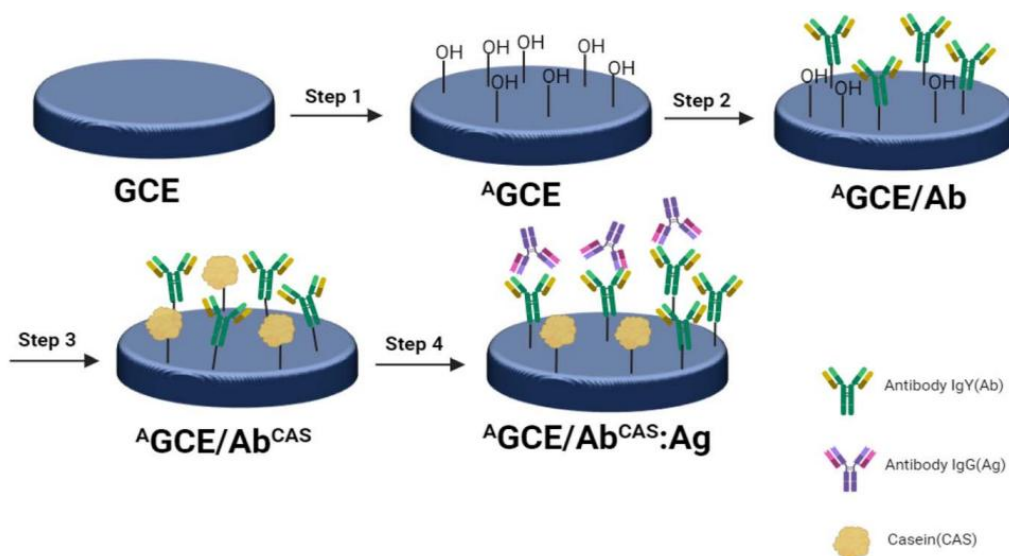


Figura 9: Representação esquemática da preparação do imunossensor e detecção de IgG. Etapa 1: ativação eletroquímica da superfície; etapa 2: Imobilização do anticorpo; etapa 3: bloqueio por CAS e etapa 4: detecção de IgG via EIS.

Fonte: Pereira et al., 2023.

4.2.1 Validação Bioanalítica

Todas as medições foram realizadas à temperatura ambiente (20°C) utilizando uma configuração eletroquímica de três eletrodos, incluindo os eletrodos de carbono vítreo puro e o eletrodo eletroquimicamente modificado de 3 mm de diâmetro (AGCE, AGCE/AbCAS) como eletrodos de trabalho, um fio de platina como contraeletrodo e Ag/AgCl saturado com KCl 3M como eletrodo de referência (adquirido da Lab Solutions, São Paulo, Brasil). Os testes de voltametria cíclica (CV) e EIS foram realizados com um Autolab PGSTAT® modelo 204 com um módulo FRA32M (Metrohn Autolab, Eco Chemie, Holanda) juntamente com seu software NOVA 2.1®. As medições de CV e EIS foram realizadas em 2 mL de KCl 100 mM com ferricianeto de potássio 5 mM. Os parâmetros operacionais para a medição do EIS foram definidos da seguinte forma: (i) frequência inicial: 10 kHz, (ii) frequência final: 0,1 Hz, (iii) potencial médio: 0,25 V e (iv) amplitude do potencial: 10 mV. As varreduras de CV foram realizadas entre 0,0 e 1,0 V com uma taxa de varredura de 100 mV s⁻¹. Os gráficos da curva voltamétrica para a apresentação final neste estudo foram desenhados utilizando o software Origin Pro 8® (Northampton, MA, EUA). Todos os experimentos foram realizados em triplicata (salvo indicação em contrário) para

garantir a consistência da tendência da resposta e calcular o desvio padrão relativo (DPR).

A seletividade do método foi avaliada a partir da incubação de AGCE/AbCAS (usado como branco) em plasma sanguíneo reativo de capivara (controle positivo), plasma sanguíneo não reativo de capivara (controle negativo) e plasma sanguíneo contendo IgG de coelho (controle negativo para o efeito matriz) na concentração de 8 ng mL⁻¹. O tempo de 10 minutos foi escolhido com base na incubação do eletrodo modificado em IgG de capivara nos diferentes tempos propostos, em comparação com o eletrodo não-modificado e o eletrodo bloqueado com caseína. Assim, o AGCE/AbCAS modificado foi exposto por 10 minutos em cada solução e, em seguida, foram realizadas as medições de CV e EIS.

A linearidade do método foi determinada em triplicata utilizando três soluções estoque com concentração de 500 ng mL⁻¹ do reagente IgG de capivara (amostra enriquecida). Em seguida, foram realizadas diluições a partir da solução estoque da amostra enriquecida nas concentrações de 20, 28, 36, 50, 80, 100 e 120 ng mL⁻¹ do reagente IgG de capivara em 100 mM de PBS pH 7,0. Assim, o AGCE/AbCAS modificado foi exposto por 10 min nessas soluções de amostra enriquecidas. Uma medição de controle também foi realizada sem a presença do reagente IgG de capivara. O limite de quantificação (LOQ) e o limite de detecção (LOD) foram determinados a partir da linearidade do método utilizando as equações (1) e (2), respectivamente.

$$\text{LOQ} = \frac{10 \times \text{Dpa}}{\text{IC}} \quad (1)$$

$$\text{LOD} = \frac{3 \times \text{Dpa}}{\text{IC}} \quad (2)$$

Dpa: desvio padrão de intersecção, IC: inclinação da curva de calibração.

A exatidão do método foi avaliada a partir do ponto médio (em ng mL⁻¹) da curva de calibração obtida a partir da linearidade do método. Três amostras foram inoculadas com IgG reagente de capivara nas concentrações de 4,4 ng mL⁻¹ (amostra em LOQ), 50,0 ng mL⁻¹ (amostra 100%) e 65,0 ng mL⁻¹ (amostra 130%). Uma

medição de controle também foi realizada sem a presença do reagente IgG de capivara.

A precisão do método foi determinada em duas etapas, em que a repetibilidade foi avaliada; isso foi realizado por um pesquisador e, posteriormente, em outro dia, a precisão intermediária foi determinada por outro pesquisador. Seis amostras foram inoculadas com plasma sanguíneo contendo IgG de capivara na concentração de 50,0 ng mL⁻¹ (amostra 100%). Uma medição de controle também foi realizada sem a presença de plasma sanguíneo com IgG de capivara.

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os testes estatísticos para validação do método foram realizados utilizando o software action stat 3.7[®], Estatcamp—Brasil, aplicado de acordo com as diretrizes do Conselho Internacional para Harmonização de Requisitos Técnicos para Produtos Farmacêuticos de Uso Humano (ICH Q2) e do Conselho Internacional para Harmonização de Validação de Métodos Bioanalíticos e Análise de Amostras de Estudo (ICH M10). Para comparação de médias e verificação da hipótese nula, foram aplicados os testes ANOVA F, Breusch Pagan e T de Student de Coeficiente Linear. Para normalidade, foi aplicado o teste de Shapiro-Wilk.

5.1 DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO IMUNOSSENSOR

O primeiro parâmetro que foi avaliado é a resistência à transferência de carga (R_{ct}) após a ligação dos agentes biológicos ao eletrodo, visto que sua condutividade muda após as etapas de formação do imunocomplexo. Como mencionado anteriormente na literatura pelos autores Karachaliou e Livaniou (2023), os imunossensores valem-se da alteração de condutividade do sinal elétrico para realizar a detecção sem que haja necessidade de marcação. As alterações foram analisadas em cada etapa do teste separadamente, por CV e EIS (Fig. 10).

Na primeira etapa, o GCE foi ativado por cronoamperometria, onde um potencial constante de 1,2 V foi aplicado por 10 minutos, promovendo a oxidação das ligações π - π presentes, diminuindo a condutividade elétrica do carbono e aumentando sua R_{ct} . Como pode ser observado na Fig. 10A, esses grupos oxidados tornam-se sítios de ligação para os grupos carboxílicos de proteínas, o que pode ser explicado pelo fenômeno de adsorção na superfície do carbono vítreo, relacionado com interações intermoleculares como ligações de hidrogênio e forças de *Van der Waals*. Tudo isso é influenciado pela concentração de agentes biológicos e pelo número de regiões doadoras ou aceitadoras de hidrogênio nessas moléculas. A segunda etapa consistiu na imobilização do anticorpo IgY na superfície do AGCE, onde foi utilizada a técnica de *drop casting* (Fig. 10B). A terceira etapa consistiu na adição de 0,5% de CAS na superfície do AGCE/Ab, onde foi observado um aumento significativo na R_{ct} , uma vez que a superfície do eletrodo está quase completamente bloqueada, o que é desejado para garantir a seletividade da ligação do imunossensor e seu alvo (Fig. 10C). Finalmente, a última etapa consiste no funcionamento do imunossensor, onde o AGCE/AbCAS é imerso no plasma sanguíneo contendo a IgG positiva para FMB (Fig. 10D).

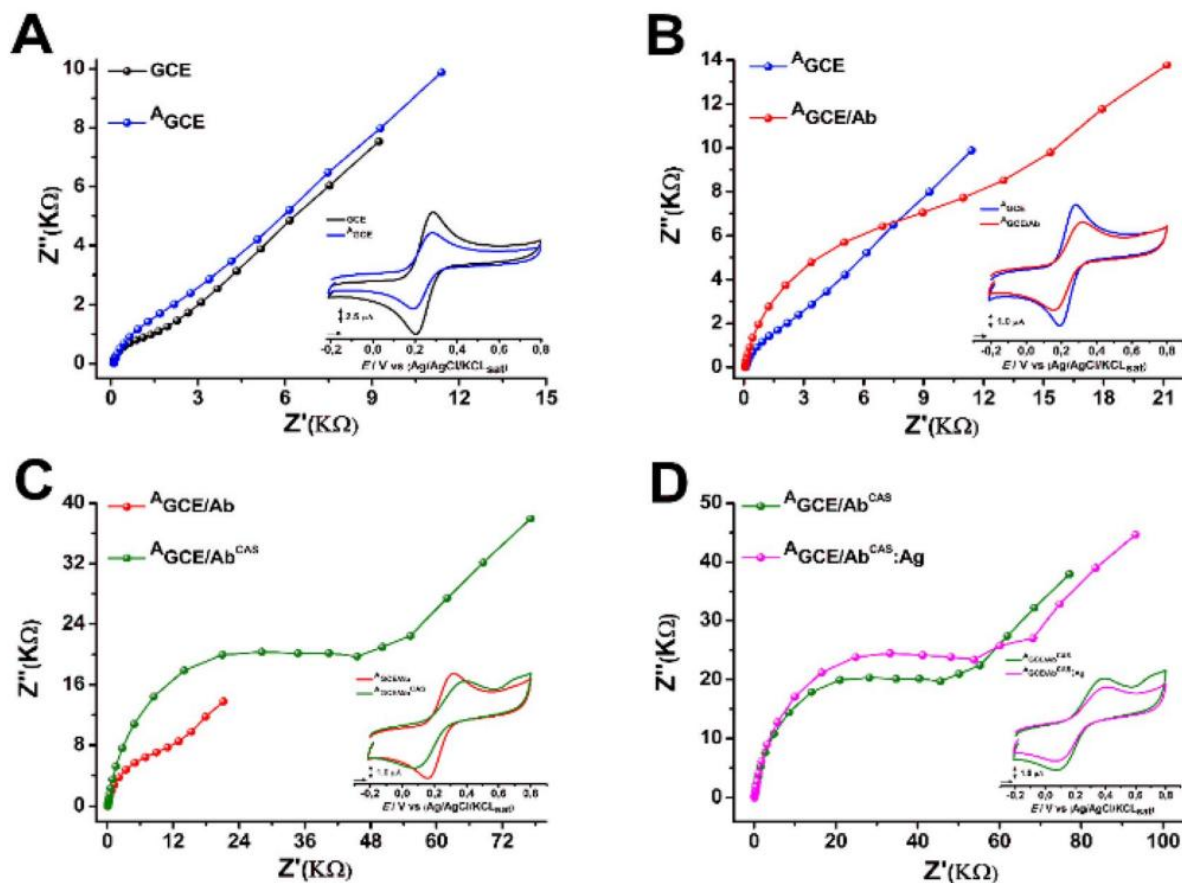


Figura 10: Diagramas de Nyquist e medidas de CV (inserção) dos estágios de modificação da GCE. (A) Ativação da GCE por cronoamperometria; (B) Etapa de ligação de IgY; (C) imersão da GCE com IgY em solução de caseína; (D) teste de imunossensor de IgY em plasma sanguíneo de capivara.

Fonte: Pereira et al., 2023.

O processo de bloqueio dos espaços restantes na superfície do eletrodo depende não apenas da concentração de CAS utilizada, mas também do tempo de incubação durante o qual o $A_{GCE/Ab}$ fica imerso nessa proteína menor, visto que, sem essa etapa, o eletrodo pode sofrer adsorção de outras proteínas que não sejam a IgY específica para o objetivo deste trabalho, tornando-o inviável. Para otimizar a seletividade do imunossensor, testes de incubação na CAS foram realizados em diferentes tempos, de forma que o melhor tempo fosse utilizado para os testes subsequentes, conforme apresentado na tabela 1.

Tabela 1: Efeito do bloqueio de CAS em diferentes níveis de modificação do eletrodo na estabilização do sinal usando diferentes tempos de incubação de IgG de capivara.

Tempo (min.)	Rct (kΩ)		
	^A GCE:Ag	^A GCE ^{CAS} :Ag	^A GCE/Ab ^{CAS} :Ag
0	0.034	0.185	0.268
5	0.045	0.424	0.570
10	0.052	0.486	0.643
15	0.084	0.493	0.684
20	0.099	0.491	0.691

Fonte: Elaboração própria

Foi observado que em 10 minutos houve estabilização do sinal analítico e, portanto, este foi o tempo escolhido para o restante das análises. Para analisar os dados de impedância, foi utilizado o modelo de Circuito Equivalente de Randles (Fig. 8), onde cada elemento do circuito é equivalente a um dos elementos do sistema eletroquímico utilizado. No caso do modelo utilizado em nosso estudo, R_s [$Z_{re} = (E^\circ \times \sin(\omega t))/(i^\circ \times \sin(\omega t + \phi))$] é um resistor equivalente à resistência da solução, R_{ct} [$Z_{re} = (E^\circ \times \sin(\omega t))/(i^\circ \times \sin(\omega t + \phi))$] é um resistor equivalente à resistência à transferência de carga entre a sonda redox [$Fe(CN)_6$] e o eletrodo, e CPE é o elemento de fase constante (CPE) [$Z_c = (1/Y^\circ(J\omega)^n)$], que representa a dupla camada elétrica formada entre a solução e o eletrodo, como se fosse um pseudocapacitor. Finalmente, W representa a impedância de Warburg, $Z_w = (1/Y^\circ \times \sqrt{J\omega})$ que equivale à contribuição que o transporte de massa oferece à interface entre a dupla camada e a superfície do eletrodo.

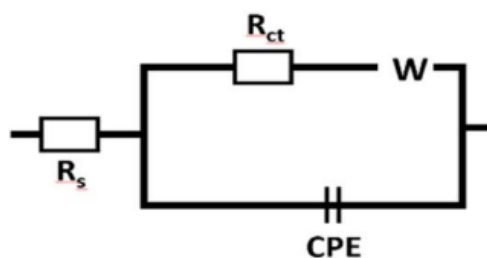


Figura 11: Circuito equivalente de Randles usado como modelo de ajuste para dados de impedância. R_s : resistência da solução; R_{ct} : resistência de transferência de carga; W : impedância de Warburg; CPE: elemento de fase constante.

5.1.1 Linearidade

O princípio de detecção foi baseado na variação da resistência à transferência de carga (ΔR_{ct}) em relação à sonda eletroquímica de ferricianeto de potássio após a reação do anticorpo IgY com a IgG anti-FMB. A ΔR_{ct} foi calculada utilizando a equação abaixo. Essa equação foi adaptada a partir de Felix e Angnes (2018) e foi utilizada para a validação do método analítico desenvolvido por Rodrigues et al. (2022):

$$\Delta R_{ct} = [R_{ct}(t_{10}) - R_{ct}(t_0)]$$

onde $R_{ct}(t_0)$ e $R_{ct}(t_{10})$ são os valores de R_{ct} antes e após 10 minutos de imunorreação.

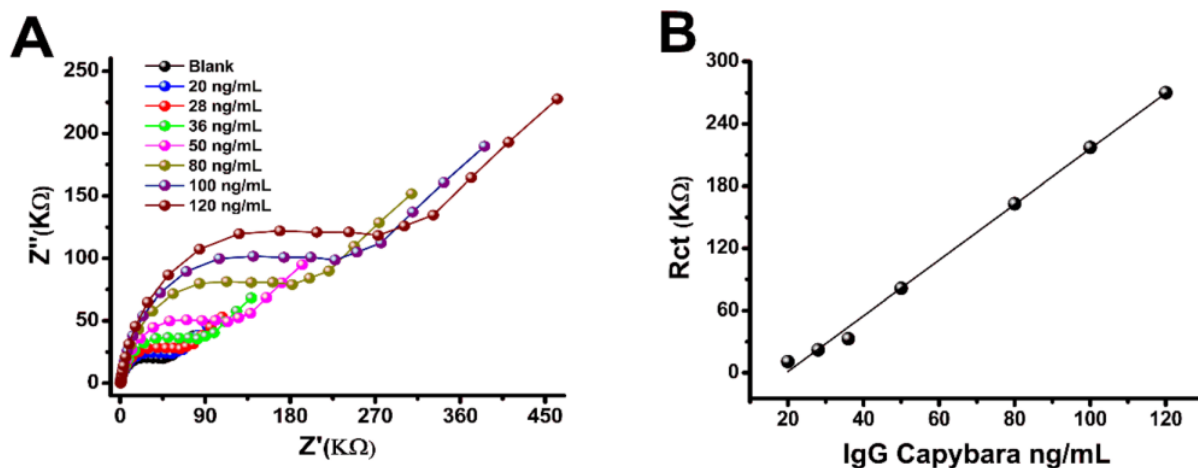


Figura 12: Diagramas de Nyquist (A) para concentrações de IgG de 20, 28, 36, 50, 80, 100 e 120 ng mL⁻¹ e a curva de calibração resultante usando o imunossensor desenvolvido (B). Todas as medições foram realizadas em triplicata.

Fonte: Pereira et al., 2023.

O diagrama de Nyquist obtido para concentrações crescentes de IgG de capivara é mostrado na Fig. 12A. A partir dos valores de ΔR_{ct} da EIS de cada concentração, uma curva de calibração foi traçada (Fig. 12B). Uma correlação linear foi encontrada entre R_{ct} e a concentração de IgG de capivara. Os resultados encontrados foram ($r^2 = 0,99$), LOD = 1,3 ng mL⁻¹ e LOQ = 4,4 ng mL⁻¹.

Para complementar o teste de linearidade do método, foram aplicadas ferramentas estatísticas para auxiliar na verificação dos dados encontrados (Tabela 2).

Tabela 2: Análise estatística dos resultados obtidos.

Teste	$\alpha=0.05$ Nível de Significância	Valor de P
Teste ANOVA F	<0.05	2.5097 ⁻³¹
Teste T Student de Coeficiente Linear	>0.05	0.1232
teste de Shapiro-Wilk	>0.05	0.2472
Homocedasticidade Breusch Pagan	>0.05	0.6270

Fonte: Elaboração própria

Como o valor de p encontrado no teste ANOVA F é menor que 0,05, foi gerada a hipótese nula (inclinação zero) ao nível de significância de 5%, enquanto o valor de p de 0,1232 do teste t é maior que 0,05, portanto, não rejeitamos a hipótese nula (intercepto igual a zero) ao nível de significância de 5%. O coeficiente de análise encontrado de 0,99 é alto. Desta forma, é possível afirmar que há uma correlação linear adequada entre concentração de IgG e Resistência Elétrica Imaginária (Z''), que demonstra o aumento das ligações IgY-IgG conforme a concentração de IgG aumenta. Como o valor de p de 0,6270 do Teste de Breusch Pagan é maior que 0,05, não rejeitamos a hipótese de igualdade de variações ao nível de significância de 5% e, portanto, temos um modelo homoscedástico. Por fim, como o p-valor de 0,2472 do teste de Shapiro-Wilk é maior que 0,05, não rejeitamos a hipótese de normalidade dos resíduos ao nível de significância de 5% (Tabela 2).

5.1.2 Seletividade e especificidade

A Figura 13 demonstra os ensaios de CV e os diagramas de *Nyquist* para os testes de seletividade e avaliação de efeito matriz, a partir dos quais foi elucidado que o AGCE/AbCAS é seletivo e específico para IgG anti-FMB em capivaras, onde nota-se um bloqueio na área eletroativa do eletrodo através da sonda $K_3[Fe(CN)_6]$ (Fig. 13A) e um aumento na R_{ct} mostrado pelo diagrama de *Nyquist* (Fig. 13B) gerado pela ligação entre IgY e IgG anti-FMB. Essa formação do imunocomplexo IgY-IgG já foi observada em estudos anteriores, principalmente na utilização de técnicas imunológicas clássicas como ELISA e Imunofluorescência indireta, demonstrando a afinidade dos anticorpos IgY para IgG de mamíferos, por exemplo, devido à facilidade que a IgY possui para se ligar ao IgG no caso destes, além de haver menor rejeição da IgY por parte dos mesmos (Kritratanasak et al., 2004; Carrara et al., 2019). O controle negativo foi realizado a partir da dosagem em plasma sanguíneo não-reativo de capivara, onde não houve aumento do R_{ct} em relação ao branco (AGCE/AbCAS) (Fig. 10B) e, por fim, o efeito de matriz foi avaliado em plasma sanguíneo de coelho por meio da avaliação do aumento do R_{ct} em relação ao branco (AGCE/AbCAS), demonstrando que não há interferência do efeito de matriz no imunossensor desenvolvido. A seletividade do método foi avaliada utilizando soluções de plasma sanguíneo com IgG reativo e não-reativo de capivara e plasma sanguíneo com IgG reativo de coelho. De acordo com Wang et al. (2014), tanto o IgG de coelho quanto o IgY de galinha possuem alta sensibilidade e comportamento semelhante em relação ao efeito matriz e, portanto, justifica-se a escolha pelo plasma do roedor como parâmetro nesse caso. Tais resultados corroboram com as vantagens descritas na literatura quanto ao uso dos imunossensores, como alta especificidade, sensibilidade e boa operacionalidade (Yang, Lu, Liu, 2022; Karachaliou, Livaniou, 2023).

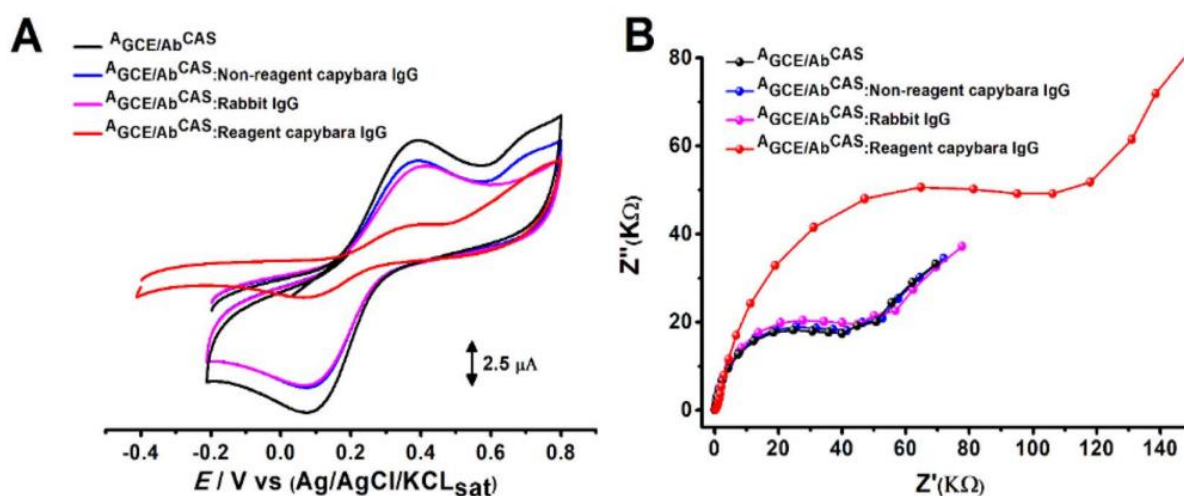


Figura 13: Medidas de CV (A) e gráficos de Nyquist (B) em plasma de capivara reigente (controle positivo), plasma de capivara não-reactivo e plasma de coelho.

Fonte: Pereira et al., 2023.

5.1.3 Acurácia e Precisão

Testes de recuperação foram realizados em três concentrações diferentes de plasma sanguíneo com IgG de capivara. A IgG foi adicionada à amostra nas concentrações de $4,4 \text{ ng mL}^{-1}$ (8,80%), $50,0 \text{ ng mL}^{-1}$ (100,00%) e $65,0 \text{ ng mL}^{-1}$ (130,00%), e cada análise foi realizada em triplicata (Tabela 3).

Tabela 3: Testes de recuperação com o imunossensor desenvolvido a partir de amostras enriquecidas com diferentes concentrações de IgG de capivara.

Amostras	Quantidade de amostras (%)	Quantidade medida (%)	Recuperação (%)
IgG de Capivara	8.80	7.9	89.77
		7.7	87.50
		8.1	92.05
	100.00	91.15	91.15
		92.76	92.76
		95.88	95.88
	130.00	124.13	95.48

	126.56	97.35
	122.60	94.31
Recuperação Média (%)		92.90
Desvio Padrão Relativo de Recuperação (%)		3.20
Nível de significância (%)		80.00 e 130.00
Nível de aceitação de DPR (Desvio Padrão Relativo)		≤ 20.0
Intervalo de Confiança 95%		2.50
Média ± IC95%		90.00% e 95.00%

Fonte: Elaboração própria

A exatidão do método proposto apresentou resultados satisfatórios para todas as três soluções enriquecidas com diferentes concentrações de IgG de capivara, com um desvio máximo de 20,0%, mantendo um intervalo de confiança adequado entre 90,00% e 95,00%. Isso comprova a capacidade do imunossensor em quantificar com precisão a IgG de capivara, além de ser possível a detecção de diferentes agentes patogênicos por imunossensores (Janik-Karpinska et al., 2022).

Os testes de precisão foram realizados para complementar a validação do método proposto. Assim, o pesquisador 1 realizou os testes de repetibilidade em um único dia. Após dois dias, testes de precisão intermediária foram realizados por outro pesquisador, a fim de garantir a repetibilidade do método analítico. A Tabela 4 apresenta os resultados encontrados. O método proposto foi preciso e repetível, com um desvio padrão relativo de 2,09% para o pesquisador 1 e 2,61% ao considerar os dados do pesquisador 2. O teste F demonstrou que não houve diferença significativa entre os valores de recuperação encontrados entre os dois analistas, pois $F_{cal} 1,56 < 5,05$ e $P\text{-valor } 0,48 > 0,05$, confirmando a precisão do método proposto, de acordo com os resultados obtidos na Tabela 4. Esses resultados corroboram com os achados anteriores de Rodrigues et al. (2022) e Garcia et al. (2020), onde diferentes agentes biológicos foram testados utilizando a metodologia da ligação IgY-IgG para fins de detecção e monitoramento terapêutico.

Tabela 4: Valores de precisão e repetibilidade do imunossensor.

Amostras	Quantidade de amostras (%)	Recuperação de amostras (%)	
		Precisão intermediária (n=6)	Repetibilidade de precisão (n=6)
IgG de Capivara	100	91.18	90.50
		93.15	94.56
		95.54	89.35
		90.33	93.67
		94.14	95.05
		93.02	94.67
		RSD (%) = 2.09	RSD (%) = 2.61

Fonte: Elaboração própria

Artigo - *An impedimetric immunosensor for diagnosis of Brazilian spotted fever in blood plasma.*

Autores: Marx Osório Araújo Pereira, Álvaro Ferreira Júnior, Edson Silvio Batista Rodrigues, Helena Mulser, Giovanna Nascimento de Mello e Silva, Wallans Torres Pio dos Santos and Eric de Souza Gil.

Revista: Analytical Methods.

Ano de publicação: 2023

Situação: Publicado.

No presente trabalho, foi apresentado, de forma inédita, um imunossensor impedimétrico para detecção de IgG anti-Febre Maculosa Brasileira em plasma sanguíneo de capivara, o que contribui imensamente para o desenvolvimento de novas metodologias diagnósticas para esta doença grave e de difícil tratamento. O sensor proposto apresentou boa sensibilidade, com um baixo limite de detecção de $1,3 \text{ ng mL}^{-1}$, e precisão das respostas analíticas para a detecção da FMB. A seletividade do método proposto também foi confirmada pela comparação entre plasma sanguíneo com IgG reagente e não reagente de capivara e plasma sanguíneo reagente com IgG de coelho, onde houve diferenças significativas nas respostas apresentadas.

Além disso, o sensor desenvolvido é um dispositivo sensível e de baixo custo, que pode ser miniaturizado para uma aplicação viável na prática clínica. Além disso, até onde se sabe, este imunossensor é o primeiro a ser desenvolvido a partir de anticorpos de ovo de galinha com o objetivo de detectar IgG anti-FMB, o que reforça o caráter inovador da ideia de pesquisa envolvida. O desenvolvimento bem-sucedido de um sensor baseado em uma arquitetura mais simples pode contribuir para avanços na construção de testes diagnósticos mais baratos e de validação analítica mais simples, o que ainda representa o principal desafio na área. Portanto, a facilidade de preparação de imunoensaios e a baixa necessidade de infraestrutura tornam esta linha de pesquisa promissora para o desenvolvimento de novos testes diagnósticos alternativos à biologia molecular e à imunologia clássica.

ABBAS Abul K, LICHTMAN Andrew H, PILLAI Shiv. **Imunologia celular e molecular**. 9.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2019.

AGRAHARI, S. *et al.* Nanoscale materials-based hybrid frameworks modified electrochemical biosensors for early cancer diagnostics: An overview of current trends and challenges. **Microchemical Journal**, v. 172, n. 106980, 2022.
<https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106980>

ALCON-CHINO, M.E.T.; DE-SIMONE, S.G. Recent Advances in the Immunologic Method Applied to Tick-Borne Diseases in Brazil. **Pathogens**, v. 11, n. 870, 2022.
<https://doi.org/10.3390/pathogens11080870>

AVELINO, K.Y. *et al.* Nanoimmunosensor for the electrochemical detection of oncostatin M receptor and monoclonal autoantibodies in systemic sclerosis. **Talanta**, v. 256, n. 124285, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2023.124285>

BAHADIR, E. B.; SEZGINTURK, M. K. A review on impedimetric biosensors. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 44, p. 248–262, 2016.
<https://doi.org/10.3109/21691401.2014.942456>

BARACU, A. M.; GUGOASA, L. A. D. Review—Recent Advances in Microfabrication, Design and Applications of Amperometric Sensors and Biosensors. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 168, n. 037503, 2021. <https://doi.org/10.1149/1945-7111/abe8b6>

BRASIL. Ministério da Saúde. **Secretaria de Vigilância em Saúde**. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços: Guia de Vigilância em Saúde, v. 1, 2019. Disponível em:
http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_saude_3ed.pdf. Acesso em: 10 de Agosto de 2025.

CARRARA, G.M.P *et al.* IgY antibody and human neurocysticercosis: a novel approach on immunodiagnosis using Taenia crassiceps hydrophobic antigens. **Parasitology**, v.147, p. 240-247, 2019. <https://doi.org/10.1017/S0031182019001446>

CARVAJAL-GAMEZ B. I. *et al.* Development and validation of a novel detection method for Rickettsia rickettsii using a loop-mediated isothermal amplification assay. **Frontiers in microbiology**, v.14, n.1276809, 2024.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1276809>

CHINNADAYYALA, S.; CHO, S. Electrochemical Immunosensor for the Early Detection of Rheumatoid Arthritis Biomarker: Anti-Cyclic Citrullinated Peptide Antibody in Human Serum Based on Avidin-Biotin System. **Sensors**, v. 21, n.1, p.124, 2020.
<https://doi.org/10.3390/s21010124>

COLLINS, A. M.; JACKSON, K. J. L. A temporal model of human IgE and IgG antibody function. **Frontiers in immunology**, v4, n. 235, 2013.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00235>

CRUICKSHANK, R. The Weil-Felix Reaction in Typhus Fever. **Journal of Hygiene**, v. 27, p. 64–69, 1927. <https://doi.org/10.1017/S0022172400031818>

DE LIMA; FERREIRA, A. L. *et al.* Rapid and accurate detection of herpes simplex virus type 2 using a low-cost electrochemical biosensor. **Cell Reports Physical Science**, v. 4, n. 101513, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.xcrp.2023.101513>

DONALISIO, M. R. *et al.* Mapping Brazilian spotted fever: Linking etiological agent, vectors, and hosts. **Acta Tropica**, v. 207, n.105496, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105496>

EVANGELISTA, L. S. M. *et al.* *Amblyomma* spp. e a relação com a febre maculosa brasileira. **Veterinária e Zootecnia**, v 28, p. 001-015, 2021. <https://doi.org/10.35172/rvz.2021.v28.478>

FATIBELLO FILHO, O.; CAPELATO, M. D. Biossensores - revisão. **Química Nova**, v. 15, n.1, p. 28-39, 1992. <https://www.researchgate.net/profile/Orlando-Fatibello-Filho/publication/234130561_biossensores/links/0912f50f73cc77c53a000000/biossensores.pdf> Acesso em 20 de Agosto de 2025.

FELIX, F. S.; ANGNES, L. Electrochemical immunosensors – A powerful tool for analytical applications. **Biosensors and Bioelectronics** v.102, p. 470–478, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.11.029>

FERREIRA JÚNIOR, A. *et al.*, Production, Characterization and Applications for Toxoplasma gondii-Specific Polyclonal Chicken Egg Yolk Immunoglobulins. **Plosone**, v. 7, n. e40391, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040391>

FERREIRA JÚNIOR, A. *et al.* Gallus gallus domesticus: immune system and its potential for generation of immunobiologics. **Ciência Rural**, v.48, n. 08 e20180250, 2018. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20180250>

GANESH, P.; KIM, S. A comparison of conventional and advanced electroanalytical methods to detect SARS-CoV-2 virus: A concise review. **Chemosphere**, v. 307, n. 1 e135645, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.135645>

GAVA, M.; BRAGA, F. B.; LANGONI, H. Aspectos etioepidemiológicos da febre maculosa brasileira: Revisão sistemática. **Veterinária e Zootecnia**, v. 29, p.001-020, 2022. <https://doi.org/10.35172/rvz.2022.v29.652>

GARCIA, L. *et al.* Impedimetric Biosensor for Bovine Herpesvirus Type 1-antigen Detection. **Electroanalysis**, v. 32, p. 1-8, 2020. <https://doi.org/10.1002/elan.201900606>

HERINGER, O.; SIRATUTI, V. **FAQ #3 Como copiar o código em laboratório?** Blogs Unicamp. 2014. Disponível em: <https://www.blogs.unicamp.br/synbiobrasil/tag/pcr/>. Acesso em: 30 de Agosto de 2025.

JANIK-KARPINSKA, E. *et al.* Immunosensores—The Future of Pathogen Real-Time Detection. **Sensors**, v.22, n. 9757, 2022. <https://doi.org/10.3390/s22249757>

- JAY, J. W. *et al.* IgG Antibody 3D Structures and Dynamics. **Antibodies**, v. 7, n. 2, p.18, 2018. <https://doi.org/10.3390/antib7020018>
- KARACHALIOU, C. E.; LIVANIOU, E. Immunosensors for Autoimmune-Disease-Related Biomarkers: A Literature Review. **Sensors**, v. 23, n. 6770, 2023. <https://doi.org/10.3390/s23156770>
- KHANMOHAMMADI, A *et al.* An overview to electrochemical biosensors and sensors for the detection of environmental contaminants. **Journal of the Iranian Chemical Society**, v.17, p. 2429–2447, 2020. <https://doi.org/10.1007/s13738-020-01940-z>
- KIM, J.; PARK, M. Recent Progress in Electrochemical Immunosensors. **Biosensors**, v. 11, n. 360, 2021. <https://doi.org/10.3390/bios11100360>
- KRITRATANASAK, S.; CHIAMPANICHAYAKUL, S.; KASINREK, W. Production of IgY Anti-Mouse from Chicken Eggs. **Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology**, v. 22, p. 61-68, 2004. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15366659/>
Acesso em: 20 de Agosto de 2025.
- LESLIE, G.A.; CLEM, L.W. Phylogeny of Immunoglobulin Structure and Function. III. Immunoglobulins of the Chicken. **The Journal of Experimental Medicine** v. 130, p. 1337-1352, 1969.
- LIU, D. Molecular Medical Microbiology. 2ª ed. **Academic Press**, p.2043-2056, 2015.
- MARQUES, G. H. *et al.* Spotted fever diagnosis using molecular methods. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. **Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine**, v.57, n. 00204, 2024. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0226-2024>
- MEHMANDOUST, M. *et al.* Electrochemical immunosensor for rapid and highly sensitive detection of SARS-CoV-2 antigen in the nasal sample. **Talanta**, v. 5, n. 240, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.123211>
- MONTEIRO, M. D. S.; SANTOS JÚNIOR, J. C.; SUSSUCHI, E. M. Eletroquímica: Eletrodos Modificados e suas Potencialidades. **Revista Virtual de Química**, v. 12, n. 5, 2020. <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20200092>
- MUCHON, J. D. *et al.* Aspectos epidemiológicos, diagnóstico e tratamento para febre maculosa brasileira. **Research, Society and Development**, v. 10, n.16, 2021. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i16.23710>
- MUNHOZ, L. S. *et al.* Avian IgY antibodies: characteristics and applications in immunodiagnostic. **Ciência Rural**, v.44, n.1, p.153-160, 2014. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782014000100025>
- NAPODANO, C. *et al.* Immunological Role of IgG Subclasses. **Immunological Investigations**, v. 50, n. 4, p. 427-444, 2020. <https://doi.org/10.1080/08820139.2020.1775643>

OBATA, M. M. S. *et al.* Determinação da imunogenicidade de antígenos totais da saliva de artrópodes ixodídeos e geração de anticorpos IgY em modelo *Gallus gallus*. **Jornal de Ciências Agrárias e da Natureza**, v. 1, n. 1, 2023.

PINTER, A. *et al.* Boletim Epidemiológico Paulista: **Informe técnico sobre Febre Maculosa Brasileira**, v18, n. 213, p. 54-78, 2021.

PEJCIC, B.; DE MARCO, R.; PARKINSON, G. The role of biosensors in the detection of emerging infectious diseases. **Analyst**, v. 131, p. 1079-1090, 2006.
<https://doi.org/10.1039/B603402K>

PEREIRA, E. P. V. *et al.* Egg yolk antibodies (IgY) and their applications in human and veterinary health: A review. **International Immunopharmacology**, v. 73, p. 293-303, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.05.015>

PEREIRA, M. O. A. *et al.* An impedimetric immunosensor for diagnosis of Brazilian spotted fever in blood plasma. **Analytical Methods**, v. 16, n. 2, 2023.
<https://doi.org/10.1039/d3ay01308a>

RIBEIRO, J. A.; JORGE, P. A. S. Applications of electrochemical impedance spectroscopy in disease diagnosis—A review. **Sensors and Actuators Reports**, v. 8, n. 100205, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.snr.2024.100205>

RIBEIRO, D. V.; SOUZA, C. A. C.; SOUZA, ABRANTES, J. C. C. Uso da Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE) para monitoramento da corrosão em concreto armado. **Revista IBRACON de Estruturas e Materiais**, v. 8, n. 4, 2015.
<http://dx.doi.org/10.1590/S1983-41952015000400007>

RODRIGUES, E., S., B.; *et al.* Impedimetric Immunosensor for On-Site Measurement of Rituximab from Invasive and Non-Invasive Samples. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 169, n. 057529, 2022. <https://doi.org/10.1149/1945-7111/ac725b>

SALOMÃO, P. E. A. Produção e Aplicação de Biossensores: Uma Breve Revisão Research, **Society and Development**, v. 7, n. 3, p. 01-11, 2018.
<https://doi.org/10.17648/rsd-v7i3.282>

SALVIANO, F. W. B. *et al.* Aspectos clínico-epidemiológicos da febre maculosa brasileira: uma perspectiva contemporânea. **Brazilian Journal of Implantology and Health Sciences**, v. 5, n. 3, p. 1052-1080, 2023. <https://doi.org/10.36557/2674-8169.2023v5n3p1052-1080>

SICILIANO, G. *et al.* Beyond traditional biosensors: Recent advances in gold nanoparticles modified electrodes for biosensing applications. **Talanta**, v. 268, n. 125280, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2023.125280>

STEWART, A. G.; STEWART, A. G. A. An Update on the Laboratory Diagnosis of Rickettsia spp. Infection. **Pathogens**, v. 10, n.1319, 2021.
<https://doi.org/10.3390/pathogens10101319>

WANG, C. *et al.* Point-of-care diagnostics for infectious diseases: From methods to devices. **Nano Today**, v. 37, n. 101092, 2021.

<https://doi.org/10.1016/j.nantod.2021.101092>

WANG, Z. *et al.* Production of chicken yolk IgY to sulfamethazine: comparison with rabbit antiserum IgG. **Food and Agricultural Immunology**, v. 26, n. 3, p. 305-316, 2015. <http://dx.doi.org/10.1080/09540105.2014.914468>

WAN, J. *et al.* Signal-Off Impedimetric Immunosensor for the Detection of Escherichia coli. O157:H7. **Scientific Reports**, v. 6, n. 19806, 2016.

<https://doi.org/10.1038/srep19806>

WU, C.-C.; CHIANG, Y. H.; CHIANG, H.-Y. A Label-Free Electrochemical Impedimetric Immunosensor with Biotinylated-Antibody for SARS-CoV-2 Nucleoprotein Detection in Saliva. **Biosensors**, v. 12, n. 265, 2022.

<https://doi.org/10.3390/bios12050265>

YANG, M.; LU, H.; LIU, S. Recent Advances of MXene-Based Electrochemical Immunosensors. **Applied Sciences**, v. 12, n. 5630, 2022.

<https://doi.org/10.3390/app12115630>