



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ - UFPI
PRÓ- REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO - PRPEG
REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA – RENORBIO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

AYRES FRAN DA SILVA E SILVA

***Desenvolvimento de um biossensor para diagnóstico de
doença de Chagas***

***TERESINA
2019***



AYRES FRAN DA SILVA E SILVA

***Desenvolvimento de um biossensor para diagnóstico de
doença de Chagas***

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, Ponto Focal no Piauí: Universidade Federal do Piauí – UFPI, para obtenção do **título de Doutor em Biotecnologia**, área: Química, subárea: Físico-química e especificidade: Eletroanalítica.

Orientador: Professor Dr. Geraldo Eduardo da Luz Júnior

**TERESINA
2019**

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco
Serviço de Processamento Técnico

S586d Silva, Ayres Fran da Silva e.
Desenvolvimento de um biossensor para diagnóstico de
doença de Chagas / Ayres Fran da Silva e Silva. – 2019.
142 f.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Rede Nordeste de
Biotecnologia, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2019.
“Orientador: Prof. Dr. Geraldo Eduardo da Luz Júnior”.

1. Imunossensor. 2. Trypanosoma cruzi. 3. Doença de Chagas.
4. Eletrodo de grafite. 5. Diagnóstico. 6. Cronopotenciometria.
I. Título.

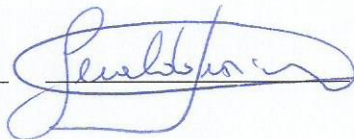
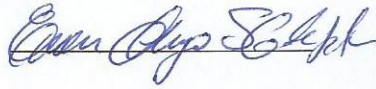
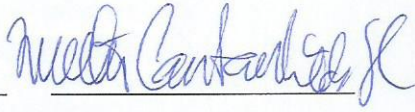

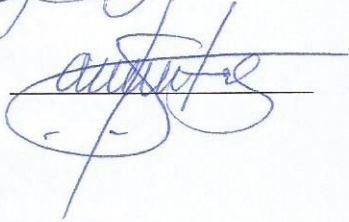
CDD 616.936 3

FOLHA DE APROVAÇÃO – DEFESA DE TESE

ALUNO: Ayres Fran da Silva e Silva

TÍTULO DO PROJETO: “Desenvolvimento de um biossensor para diagnóstico de doença de Chagas.”

PROFESSOR ORIENTADOR: Prof. Dr. Geraldo Eduardo da Luz Júnior

BANCA EXAMINADORA:	CONCEITO	ASSINATURA
Prof. Dr. Geraldo Eduardo da Luz Júnior - UESPI (Presidente)	<u>Aprovado</u>	
Prof. Dr. Everson Thiago Santos Gerônimo da Silva - UFPI (Examinador)	<u>Satisfatório</u> <u>Aprovado</u>	
Prof. Dr. Welter Cantanhede da Silva - UFPI (Examinador)	<u>Aprovado</u>	
Prof. Dr. José Luiz Silva Sá – UESPI (Examinador)	<u>APROVADO</u>	
Prof. Dr. Reginaldo da Silva Santos - UESPI (Examinador)	<u>APROVADO</u>	

DATA DA AVALIAÇÃO: 25 de março de 2019.

HORÁRIO: 14h

LOCAL: No Auditório do Geratec - UESPI

Aquele que sempre é providencial!



In memoria,
Professora Dra. Regina Célia de Assis
por todos os incentivos prestados



À minha esposa,
Ana Paula Oliveira da Silva e Silva
por compartilhar os momentos
alegres e triste durantes estes anos



Ao nosso amor,
Enzo Heloan Oliveira da Silva
Pelas felicidades e alegrias trazida a nossa
existência

Dedico este trabalho.

Sigamos!

Agradecimentos

✓ *Ao campus de Parauapebas da Universidade Federal Rural da Amazônia - Ufra, por incentivar a capacitação*

✓ *À Pró-Reitoria de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico PROPED-PROGRAMA PRODOUTORAL/UFRA/CAPES pelas bolsas de estudo e de moradia concedida*

✓ *FAPEPI/MS-DECIT/CNPq/SESAPI N° 002/2016 - PPSUS pelo fomento à pesquisa*

✓ *O LABORATÓRIO CENTRAL DE SAÚDE PÚBLICA " DR. COSTA ALVARENGA; LACEN-PI. Em especial a Iluska Martins Pinheiro.*

✓ *Ao Geraldo pelo aceite de orientação e orientação durante este trabalho. “primeiro orientador de iniciação científica”.*

✓ *A toda família Geratec.*

✓ *Aos familiares pelos incentivos, em especial minha mãe **Antônia Maria da Silva e Silva**; meu irmão **Kerley Fran da Silva e Silva**; minha tia Maria Mourão Viana; meu compadre e primo Artenio Pereira Lima; meu primo Luciano Alcântara da Silva, minha sobrinha Rhianna Alcântara dos Santos.*

✓ *A todos os amigos que, direta ou indiretamente participaram de minha vida e de meu trabalho*

Ativos neste trabalho: Natalia da Silva Ferreira sempre muito prestativa; Antonio Rafael de Oliveira sempre prestativo; Afra Maria do Carmo Bandeira do Nascimento muitos incentivos; Maelson Sousa Nunes pelos embates bons em eletroquímica; Leandro de Miranda Santos por sempre ajudar e Rildo Santos Silva (Rildo Bogéa) pelo irmão que ganhei nesta minha existência

✓ *A todos meus professores que fizeram parte da minha trajetória*

Neste trabalho professores Dr.(a): José Luiz S. Sá; Fernando Aécio de Amorim Carvalho; Maria do Carmo de Carvalho e Martins; Roberto Alves de S. Luz; Everson Thiago S. G. da Silva; João Mariz G. Neto; Francisco das Chagas Alves, Lima Vagner Jose Mendonca, Reginaldo da Silva Santos; Welter Cantanhede da Silva; José Ribeiro dos Santos Júnior

Currículo

Formação acadêmica

- ❖ *Licenciatura em Química* – Universidade Estadual do Piauí – UESPI (2004 – 2008).
- ❖ *Bacharel em Química* – Universidade Federal do Piauí – UFPI (2004 – 2009).
- ❖ *Mestrado em Química* – Universidade Federal do Piauí – UFPI (2010 – 2013).

Publicações

Artigos

- ❖ SOUSA, R.C.; GOMES, R.W.S.; BARROS FILHO, B.A.; [SILVA E SILVA, A.F.](#); ZIERER, M.S. The prevalence of overweight and obesity in the city of Floriano, Piauí. *International Journal of Development Research*; v.8, p.23167-23172, 2018.
- ❖ DE ANDRADE, RAÍSSA SILVA BACELAR; [SILVA E SILVA, AYRES FRAN](#); ZIERER, MAXIMILIANO DE SOUZA. Avaliação das dificuldades de aprendizagem em bioquímica dos discentes da Universidade Federal do Piauí. *Revista de Ensino em Bioquímica*, v.15, p.24-39, 2017.
- ❖ [A.F. DA SILVA E SILVA](#), G.E. DA LUZ JÚNIOR, Prospecção tecnológica: potencialidades de diagnóstico para doenças de Chagas, *Revista Brasileira de Inovação Tecnológica em Saúde*, v.6, p.15-31, 2016.
- ❖ [SILVA E SILVA, AYRES FRAN](#); Atapulgita. *Cadernos de prospecção*, v.2, p.36-39, 2009.

Livros

- ❖ ASSIS, R.C.; [SILVA E SILVA, AYRES FRAN](#); *Fundamentos de Bioquímica*, ISBN: 978-85-7463-580-4, p.199, 2012.

Experiências Profissionais

- ❖ Trainee da **Industrias Dureino S.A.**, Teresina – PI, 2009 a 2010.
- ❖ Professor do Programa Darcy Ribeiro da **Universidade Estadual do Maranhão** – UEMA, 2010 – 2011.
- ❖ Professor de Especialização de Bioquímica na **Faculdade Evangélica do Piauí** – FAEPI, 2010 – 2011.
- ❖ Professor da **Universidade Federal do Piauí** – UFPI, **Universidade Aberta do Brasil**, Capes, Teresina – PI, 2011 – 2012.
- ❖ Professor de Química TP-20 no **Centro de Ensino Paulo VI** – São Luís – MA, 2011 – 2013.
- ❖ Professor Substituto TP-20 no Departamento de Bioquímica e Farmacologia/Centro de Ciências da Saúde, **Universidade Federal do Piauí** – UFPI, Teresina – PI, 2011 – 2013.
- ❖ Professor Efetivo da **Universidade Federal Rural da Amazônia** – Ufra, Parauapebas – PA, 2013 – Atual.

Resumo

Este trabalho consistiu na construção e desenvolvimento de uma cela eletroquímica nova e versátil, para a reação de hemaglutinação com eletrodo de grafite modificado por hemácias sensibilizadas pelos antígenos de *Trypanosoma cruzi* o que permitiu a utilização para diagnóstico da doença de Chagas em ambiente aberto, sem a necessidade de utilização de reagentes especiais, e 10 vezes menos suspensões de hemácias sensibilizadas. A doença de Chagas é uma infecção responsável por óbitos e por perda da capacidade de trabalho em muitos países, principalmente os países da América Latina. Por se tratar de uma doença negligenciada nos últimos anos têm recebido enorme atenção. Entretanto, apesar do grande avanço recente no desenvolvimento e aplicação de tecnologia, ainda existem vários campos a serem explorados, e a fim de melhorar o diagnóstico sorológico da doença de Chagas em laboratório e em campo. Os eletrodos de grafite modificados utilizados para diagnosticar a doença de Chagas foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), voltametria cíclica (VC), espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) e cronopotenciometria. Os resultados destas caracterizações indicaram que os eletrodos de grafite foram modificados pelas hemácias sensibilizadas e a interação com controle positivo ou negativo para doença de Chagas, através da VC mostrou uma diminuição de corrente, 16,8% e 0,44%, respectivamente. Enquanto a EIE mostrou um aumento resistência de troca de carga 25,17% e 2,27%, respectivamente. A cronopotenciometria aplicada as 18 amostras humana com e sem doença de Chagas apresentaram alta correlação com teste comercial ensaio imunoenzimático para o diagnóstico da infecção por *Trypanosoma cruzi*, o coeficiente de correlação para amostras positivas foi 0,9514, já para amostras negativas foi 0,9829. O tempo gasto para o diagnóstico da doença de Chagas por cronopotenciometria foi de 100 s. Como conclusão desse trabalho de tese, pode-se afirmar que a construção da cela eletroquímica se mostrou rápida e sensível, um sensor eletroquímico inédito para reação de hemaglutinação de anticorpos específicos contra hemácias sensibilizadas para diagnóstico da doença de Chagas.

Palavras-chave: Imunossensor; *Trypanosoma cruzi*; Doença de Chagas; Eletrodo de grafite; Diagnóstico; Cronopotenciometria.

Abstract

This work consisted in the construction and development of a new and versatile electrochemical cell for the reaction of hemagglutination with graphite electrode modified by erythrocytes sensitized by the *Trypanosoma cruzi* antigens, which allowed the use for the diagnosis of Chagas' disease in an open environment without need for special reagents, and 10 times less sensitized erythrocytes suspensions. Chagas disease is an infection responsible for deaths and loss of working capacity in many countries, especially in Latin America. Because it is a neglected disease in recent years, they have received tremendous attention. However, despite the recent breakthrough in the development and application of technology, there are still several fields to be explored and in order to improve the serological diagnosis of Chagas disease in the laboratory and in the field. The modified graphite electrodes used to diagnose Chagas' disease were characterized by scanning electron microscopy (SEM), cyclic voltammetry (CV), electrochemical impedance spectroscopy (EIS) and chronopotentiometry. The results of these characterizations indicated that the graphite electrodes were modified by the sensitized red cells and the interaction with a positive or negative control for Chagas' disease, through CV, showed a current decrease, 16.8% and 0.44%, respectively. While the EIS showed increased load-exchange resistance 25.17% and 2.27%, respectively. Chronopotentiometry applied to the 18 human samples with and without Chagas' disease showed a high correlation with commercial immunoenzymatic assay for the diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection, the correlation coefficient for positive samples was 0.9514, whereas for negative samples it was 0.9829. The time taken to diagnose Chagas' disease by chronopotentiometry was 100 s. As a conclusion of this thesis, it can be stated that the construction of the electrochemical cell was fast and sensitive, an electrochemical sensor unheard of for the hemagglutination reaction of specific antibodies against erythrocytes sensitized for diagnosis of Chagas' disease.

Keywords: Immunosensor; *Trypanosoma cruzi*; Chagas disease; Graphite electrode; Diagnosis; Chronopotentiometry.

Sumário

1. Introdução	17
Referências	19
2. Objetivos	23
2.1. Objetivo Geral	23
2.2. Objetivos Específicos	23
3. Revisão da Literatura	24
3.1. Doenças Tropicais Negligenciadas	24
3.2. Doença de Chagas – Aspectos Gerais	27
3.2.1 Transmissão Vetorial	27
3.2.2. Transmissão Transfusional	29
3.2.3. Transmissão Congênita	30
3.2.4. Transmissão Acidental	31
3.2.5. Transmissão Sexual	32
3.2.6. Transmissão Oral	33
3.2.7 Condições Clínicas para Doença de Chagas	34
3.2.7.1. Fase Aguda	34
3.2.7.2. Fase Latente ou Indeterminada	36
3.2.7.3. Fase Crônica	36
3.2.8. Diagnóstico	37
3.2.8.1. Detecção Direta do Parasita	38
3.2.8.2. Detecção Indireta do Parasita	39
3.2.8.3. Hemaglutinação Indireta ou Passiva	41
3.2.8.3.1 Histórico da Hemaglutinação Indireta ou Passiva	41
3.2.8.3.2. Testes com Reagentes Comerciais de Hemaglutinação Indireta	43
3.2.8.3.3. Princípio da Reação Hemaglutinação Indireta	44
3.2.8.3.4. Teste de Reação de Hemaglutinação Indireta Semiquantitativo	45
3.2.8.3.5. Imunofluorescência Indireta	47
3.2.8.4. Ensaio Imunoenzimático para o Diagnóstico da Infecção por <i>T. Cruzi</i>.	48
3.2.8.4.1. Princípio do Teste EI-Recombinante Chagas-Biomanguinhos®	49
3.2.8.5. Pesquisa em Biossensores para o Diagnóstico da Doença de Chagas	50
3.3. Eletrodo Lápis de Grafite	54
3.4. Métodos Eletroanalíticos em Imunoensaios	55
3.4.1. Voltametria Cíclica (VC)	56
3.4.2. Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE)	59
3.4.3. Cronopotenciometria	62
3.5. Prospecção Tecnológica: Potencialidades de Diagnóstico para Doenças de Chagas com Foco em Bioeletroquímica Relacionado a Reação de Hemaglutinação.	65
Referências	73
4. Seção Experimental	102
4.1. Materiais e Reagentes.	102
4.2. Contagem de Células Sensibilizadas por Antígenos de <i>T. Cruzi</i> em Câmara de Neubauer	102

4.3. Preparação do Biossensor com Hemácias de Aves Sensibilizadas com Antígenos <i>T. Cruzi</i>.	103
4.4. Morfologia da superfície do eletrodo de trabalho	103
4.5. Medidas Eletroquímicas de Caracterização dos Eletrodos	104
4.5.1. Construção da Cella Eletroquímica	104
4.5.2. Medidas de VC e EIE	104
4.6. Amostras Avaliadas por Testes Convencionais	105
4.7. Amostras Avaliadas por Cronopotenciometria	106
4.7.1. Preparo das Amostras Humanas para Análise por Cronopotenciometria	106
4.7.2. Parâmetros Utilizados para as Medidas de Cronopotenciometria	106
4.7.3. Medidas de Cronopotenciometria	106
4.7.4. Análise de Agrupamento Hierárquico das Medidas de Cronopotenciometria dos Sistemas: GETC, GETCN e GETCP	106
4.8. Limpeza do eletrodo de trabalho	107
5. Resultados e Discussões	108
5.1. Contagem de Células Sensibilizadas por Antígenos de <i>T. Cruzi</i> em Câmara de Neubauer.	108
5.2. Caracterização Morfológica e Constitutiva da Superfície dos Eletrodos: GE, GETC, GETCN e GETCP.	109
5.3. Caracterização Eletroquímica dos Sistemas	111
Referências	123
6.0 Conclusões	125
Apêndice A	126

Lista de Figuras

Figura 1. Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> que inclui hospedeiros triatomíneos e vertebrados.	28
Figura 2. Desenho esquemático de HAI.	44
Figura 3. Desenho esquemático da visualização na placa de microtitulação de amostra reagente, de amostra indeterminada e de amostra não reagente de HAI.	45
Figura 4. Desenho esquemático de diluição seriada da amostra para o teste de HAI	46
Figura 5. Desenho esquemático das reações de cada uma das diluições da amostra no HAI. R – Amostra reagente, I – Amostra indeterminada e NR – Amostra não reagente.	47
Figura 6. Esquema da resposta do teste IFI	48
Figura 7. Esquema da resposta do teste EI-Recombinante-Chagas-Biomanguinhos®	49
Figura 8. Representação de uma (A) cela eletroquímica com (B) tampa para acoplamento do (C) o eletrodo de trabalho, (D) o eletrodo auxiliar ou contra eletrodo e (E) o eletrodo de referência.	57
Figura 9. Voltamograma cíclico para transferência de carga reversível	58
Figura 10. Alguns sistemas que podem ser analisados empregando a EIE.	60
Figura 11. Ilustração do Diagrama Nyquist e o circuito elétrico equivalente de Randles.	61
Figura 12. Curva cronopotenciométrica típica	64
Figura 13. Representação esquemática da preparação imunossensor para diagnóstico da dengue.	65
Figura 14. Distribuição dos surtos de doença de Chagas aguda ocorridos no Brasil, em destaque para Região Amazônica Legal, 2005 a 2013.	70
Figura 15. Três eletrodos utilizados no estudo: A) eletrodo de grafite, B) eletrodo de referência, C) eletrodo auxiliar e D) cela eletroquímica.	104
Figura 16. Ilustração das modificações ocorridas na superfície do eletrodo de grafite	107
Figura 17. Imagens das células sensibilizadas por antígenos de <i>T. Cruzi</i> em lamínulas fotografada em microscópio óptico que mostra rugosidade (elipses com borda em laranja) na superfície das células que pode ser relacionada a sensibilização das células por antígenos de <i>T. Cruzi</i> .	108
Figura 18. Micrografias eletrônicas de varredura de (A) GE, (B) GETC, (C) GETCN (elipse com borda laranja destaca a aglutinação) e (D) GETCP (elipse com borda verde destaca o complexo proteico antígeno-anticorpo.	110
Figura 19. (A) Voltamogramas cíclicos de $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ 5 mmol L^{-1} em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 7,0) para GE. (B) parcelas de correntes de pico anódico e catódico vs raiz quadrada da velocidade de varredura.	112
Figura 20. Voltamogramas cíclicos de $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ 5 mmol L^{-1} em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 7,0) para os sistemas GE, GETC, GETCN e GETCP, 100 mVs^{-1} .	113

- Figura 21.** Diagramas de Nyquist com um potencial de 0,22 V na presença de 5 mM $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ (pH=7.0) em solução 0,5M KCl para os GE, GETC, GETCN e GETCP. Amplitude = 10 mV. Faixa de frequência: 1 a 10^5 Hz. Variando o volume de controle positivo e negativo. **115**
- Figura 22.** Diagrama de Nyquist obtido para eletrodos: GE, GETC, GETCN e GETCP. Controle positivo e controle negativo para volume de 10 μ L. que caracterizam ou não a doença de Chagas. Onde parâmetros do circuito equivalente são: R_s é a resistência da solução; R e C são, respectivamente, a resistência e a capacitância associadas a uma camada na superfície do eletrodo; Q é a capacitância da dupla camada elétrica (elemento de fase constante); R_{ct} é a resistência de transferência de carga e W é a impedância de Warburg. **117**
- Figura 23.** Resposta dinâmica do GETC das 18 amostras que caracterizam ou não a doença de Chagas. **119**
- Figura 24.** Dendrograma da variação de potencial em um tempo de 500 s para os sistemas: GETC, GETGN e GETCP. **121**
- Figura 25.** Curva de correlação entre os resultados obtidos pela cronopotenciometria e os resultados com o kit ensaio imunoenzimático para o diagnóstico da infecção por *T. Cruzi*. Para amostras positivas (verde) e para amostras negativas (vermelho). **122**

Lista de Tabelas

Tabela 1. As 20 doenças tropicais negligenciadas segundo a Organização Mundial da Saúde.	26
Tabela 2. Vantagens e desvantagens de técnicas para o diagnóstico da doença de Chagas. * LD: limite de detecção.	54
Tabela 3. Casos confirmados de doença de Chagas aguda, segundo ano de notificação e forma de transmissão. Brasil, 2000 a 2013.	68
Tabela 4. Casos confirmados de doença de Chagas aguda, segundo Região, Unidade da Federação de residência e forma de transmissão. Brasil, 2000 a 2013	69
Tabela 5. Valores dos parâmetros de ajuste para o circuito equivalente para os sistemas GE, GETC, GETCN e GETCP.	118
Tabela 6. Resultados dos testes sorológicos das 18 amostras com HAI, IFI, EI para diagnóstico da doença de Chagas e medidas de cronopotenciometria	120

Lista de Abreviaturas e Siglas

- a** – Atividade de Equilíbrio
- AC – Do Inglês Alternating Current (Corrente Alternada)
- AMM – Administração em Massa de Medicamentos.
- C – Capacitância da Dupla Camada Elétrica
- Co – Concentração em Massa da Espécie
- CAAE – Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
- CDs – Conjuntos Diagnósticos
- CPE – Do Inglês Constant Phase Element (Elemento de Fase Constante)
- Do – Coeficiente de Difusão
- DC – Do Inglês Direct Current (Corrente Contínua)
- Ec – Potencial da Cela
- E_c^0 – Potencial Padrão do Eletrodo
- ECS – Eletrodo de Calomelano Saturado
- EI - Ensaio Imunoenzimático
- EIE – Espectroscopia de Impedância Eletroquímica
- ELISA – Do Inglês Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ensaio de imunoabsorção enzimática)
- Epa – Potencial de Pico Anódico
- Epa/2 – Potencial de Meio Pico Anódico
- Epc – Potencial de Pico Catódico
- Epc/2 – Potencial de Meio Pico Catódico
- EPO – “European Patent Convention”
- F – Constante de Faraday
- GE – Grafite
- GETC – Componentes Eritrocitários Sensibilizados por Antígenos de *T. Cruzi*
- GETCN – GETC com Soro Controle Negativo
- GETCP – GETC com Soro Controle Positivo
- HAI – Reação de Hemaglutinação Indireta
- I – Amostra Indeterminada
- IFI – Imunofluorescência Indireta
- INPI – Instituto Nacional da Propriedade Industrial
- Ip – Corrente de Pico
- Ipa – Corrente de Pico Anódico
- Ipa/2 – Corrente de Meio Pico Anódico
- Ipc – Corrente de Pico Catódico
- Ipc/2 – Corrente de Meio Pico Catódico
- Ig – Anti-Imunoglobulinas Humanas
- IgG – Imunoglobulinas Humanas G
- IgM – Imunoglobulinas Humanas M
- LD – Limite de Detecção
- MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura
- n – Número de Elétrons
- NR – Amostra Não Reagente
- Ox – Formas Oxidadas

PCR – Do Inglês Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)
Q – Capacitância de Camada Dupla (Elemento de Fase Constante)
qRT-PCR – Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real
Red – Formas Reduzidas
Rs – Resistência da Solução
Rtc – Resistência a Transferência de Carga
R Ω – Resistência Ôhmica da Solução Eletrolítica
RMC – Ressonância Magnética Cardíaca com Contraste
T – Temperatura Absoluta
TMB – Tetrametilbenzidina
USPTO – “United States Patent and Trademark Office”
 ν – Velocidade de Varredura
VC – Voltametria Cíclica
VPL – Varredura de Potencial Linear
Z – Impedância
Z' – Impedância Real
-Z'' – Impedância Imaginária
W – Impedância de Warburg
WIPO – “World Intellectual Property Organization”
 ΔE_p – Diferença entre o Potencial de Pico Anódico e de Pico Catódico
% ΔI_{pa} – Percentual de Corrente de Pico Anódica
% ΔR_{ct} – Diferença Relativa Percentual Rct

1. Introdução

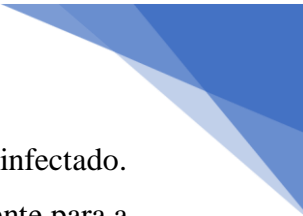
A doença de Chagas é uma zoonose descoberta em 1909 por Carlos Chagas, a doença é causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. Cruzi*) que requer um vetor (hematófagos triatomíneos) e um humano ou mamífero para completar seu ciclo de vida (STOLF *et al.*, 1987)

O *T. Cruzi* é distribuído em países americanos, sendo um problema de saúde pública em áreas rurais e áreas urbanas em 19 países. Países com doenças endêmicas são México, países da América Central, Brasil, Peru, Bolívia, Paraguai, Uruguai e Argentina. Países como Estados Unidos, Japão, Espanha e Austrália, tem seus dados aumentados sobre a doença de Chagas, fator imigração (SCHMUNIS e YADON, 2010; ANTINORI *et al.*, 2017).

Passos são importantes para o controle da infecção da doença de Chagas, passos que se fundamenta no controle de vetores, na seleção sistemática de doadores de sangue nos países endêmicos, no tratamento da transmissão congênita, no tratamento de crianças infectadas e de casos agudos, e no diagnóstico (GUHL e LAZDINS-HELDS, 2007). Medidas de intervenções como essas contribuem para controlar a transmissão em áreas endêmicas e são responsáveis para mostrar a força do controle da doença de Chagas (DIAS *et al.*, 2002; DA SILVA, 2019). Chile, Uruguai e Brasil, foram certificados livres da transmissão pelo *Triatoma infestans*, principal vetor domiciliado nesses países (RAMOS JR e CARVALHO, 2001; SCHOFIELD *et al.*, 2006; BUSTAMANTE GOMEZ, 2016; CARVALHO *et al.*, 2018).

Variáveis do controle da doença de Chagas ainda são evidentes, das quais podem ser destacadas a transmissão via oral no norte do Brasil, devido à ingestão de alimentos infectados pelo *T. Cruzi*, como açaí e cana-de-açúcar (BARBOSA *et al.*, 2012; XAVIER *et al.*, 2014; FIDALGO *et al.*, 2018) e a contaminação por transfusão de sangue em países onde a triagem de doadores de banco de sangue não incluem o controle do soro agente infeccioso. O risco de receber sangue contaminado aumenta em proporção direta tanto à prevalência da infecção na população doadora quanto ao número de transfusões recebidas, com sangue total ou componentes sanguíneos infectados.

O diagnóstico da infecção por *T. Cruzi* é fundamentado em epidemiologia e clínicas, mas sua etiologia depende da confirmação por diagnóstico laboratorial (BALOUZ *et al.*, 2017; KRATZ *et al.*, 2018). Este último pode ser alcançado através da

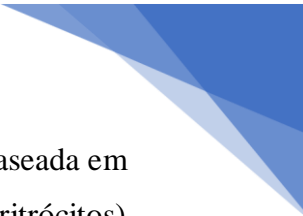


detecção direta do parasita ou através da resposta imunológica do hospedeiro infectado. A detecção de antígeno nos soros sanguíneos poderia ser benéfico exclusivamente para a fase aguda da doença de Chagas (DA SILVA e DA LUZ JÚNIOR, 2016; DIAS *et al.*, 2016). Para fase crônica da doença de Chagas o diagnóstico etiológico passa pela investigação sorológica, testes usados na rotina de análises clínicas levam em consideração a especificidade e a sensibilidade (DE FUENTES-VICENTE *et al.*, 2018; PINTO *et al.*, 2018). Os seguintes testes sorológicos são utilizados para diagnosticar a doença de Chagas: aglutinação, fixação de complemento, precipitação, imunofluorescência, hemaglutinação e ELISA, dos quais os mais utilizados são reação de hemaglutinação indireta (HAI), imunofluorescência indireta (IFI) e ELISA (DE MARCHI *et al.*, 2007; DIAZ-BELLO *et al.*, 2008; CARVALHO *et al.*, 2011; CARNEVALI *et al.*, 2017; AZEVEDO *et al.*, 2018; PEREZ-AYALA *et al.*, 2018; SGUASSERO *et al.*, 2018; TAPIA-GARAY *et al.*, 2018). Importante destacar quando técnicas convencionais apresentam resultados conflitantes, “Western blot” tem sido utilizado, principalmente para resultados em que a titulação do soro apresenta resultados divergentes (GONTIJO e MELO, 2004; VARGAS *et al.*, 2018).

Na superfície de transdutores a imobilização de antígenos e anticorpos é notório em estudos com vários substratos de interesse na área industrial, clínica e biológica (CASTRO *et al.*, 2018; SALOMÃO e DEVELOPMENT, 2018). Os métodos que utilizam imunossensores apresentam características como: rapidez, especificidade e sensibilidade (FOGUEL *et al.*, 2011; JAROCKA *et al.*, 2014; REGIART *et al.*, 2016; SANTOS *et al.*, 2016; CAMPUZANO *et al.*, 2017). Outra característica importante é a utilização de pequenos volumes de amostras, fato que diminui os custos quando comparado aos métodos ditos convencionais.

Os imunossensores são caracterizados e avaliados por voltametria cíclica (VC) (AYDIN *et al.*, 2019), espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) (CORDEIRO *et al.*, 2019), crono(amperometria) (PAKCHIN *et al.*, 2018), varredura de potencial linear (SHARMA *et al.*, 2014), e (JIA *et al.*, 2015). VC e EIE são possivelmente as técnicas eletroquímicas mais comumente utilizadas na caracterização de processos de eletrodos eletroquímicos (AYDIN, E. B. *et al.*, 2018; AYDIN, M. *et al.*, 2018; HAJI-HASHEMI *et al.*, 2018; AYDIN *et al.*, 2019; HAJI-HASHEMI *et al.*, 2019).

Considerando a importância das doenças negligenciadas, em especial a doença de Chagas. Uma cela eletroquímica simples de baixo custo e que forneça diagnóstico rápido para doença de Chagas, fundamentada na reação de hemaglutinação indireta é inédita.



Este trabalho de tese tem como base a construção de uma cela eletroquímica baseada em um eletrodo de trabalho de grafite (GE) modificado por hemácias (eritrócitos) sensibilizadas por antígenos de *T. Cruzi*. Os resultados das amostras de soro humano obtidas pelo imunossensor foram comparados com os obtidos por ensaio imunoenzimático para o diagnóstico da infecção por *T. Cruzi*.

Referências

ANTINORI, S. et al. Chagas disease in Europe: A review for the internist in the globalized world. **European Journal of Internal Medicine**, v. 43, p. 6-15, Sep 2017.

AYDIN, E. B.; AYDIN, M.; SEZGINTURK, M. K. Electrochemical immunosensor based on chitosan/conductive carbon black composite modified disposable ITO electrode: An analytical platform for p53 detection. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 121, p. 80-89, Dec 2018.

AYDIN, M.; AYDIN, E. B.; SEZGINTURK, M. K. A highly selective electrochemical immunosensor based on conductive carbon black and star PGMA polymer composite material for IL-8 biomarker detection in human serum and saliva. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 117, p. 720-728, Oct 2018.

_____. Electrochemical immunosensor for CDH22 biomarker based on benzaldehyde substituted poly(phosphazene) modified disposable ITO electrode: A new fabrication strategy for biosensors. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 126, p. 230-239, Feb 2019.

AZEVEDO, E. D. N. et al. Binding capacity of mannose-binding lectin (MBL) is associated with the severity of chronic Chagas cardiomyopathy. **Parasitology International**, v. 67, n. 5, p. 593-596, Oct 2018.


BALOUZ, V.; AGUERO, F.; BUSCAGLIA, C. A. Chagas Disease Diagnostic Applications: Present Knowledge and Future Steps. In: ROLLINSON, D. e STOTHARD, J. R. (Ed.). **Advances in Parasitology, Vol 97**. San Diego: Elsevier Academic Press Inc, v.97, 2017. p.1-45. (Advances in Parasitology). ISBN 978-0-12-811559-6; 978-0-12-811558-9.

BARBOSA, R. L. et al. Survival in vitro and virulence of *Trypanosoma cruzi* in açai pulp in experimental acute Chagas disease. v. 75, n. 3, p. 601-606, 2012.

BUSTAMANTE GOMEZ, M. B. **Caracterização e distribuição da resistência a deltametrina de populações silvestres e domésticas de *Triatoma infestans* da Bolívia**. 2016.

CAMPUZANO, S.; YANEZ-SEDENO, P.; PINGARRON, J. M. Electrochemical Biosensing for the Diagnosis of Viral Infections and Tropical Diseases. **Chemelectrochem**, v. 4, n. 4, p. 753-777, Apr 2017.

CARNEVALI, V. et al. Prevalence of *Trypanosoma cruzi* and organ alterations in virginia opossums (*Didelphis virginiana*) from western Mexico - short communication. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 65, n. 4, p. 505-509, Dec 2017.



CARVALHO, G. L. B. et al. Doença e Chagas: Sua transmissão através do consumo de açai. v. 1, n. 1, p. 1-13, 2018.

CARVALHO, M. E. D. et al. Programa de Controle da Doença de Chagas no Estado de São Paulo: aspectos sorológicos e entomológicos de inquéritos entre escolares de ensino fundamental. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, p. 95-106, 2011.

CASTRO, J. et al. Determinação de amônia no ar utilizando um sensor piezelétrico de quartzo. **J Eclética Química Journal**, v. 36, n. 2, p. 21-49, 2018.

CORDEIRO, T. A. R. et al. Label-free electrochemical impedance immunosensor based on modified screen-printed gold electrodes for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Talanta**, v. 195, p. 327-332, Apr 2019.

DA SILVA, A. F.; DA LUZ JÚNIOR, G. E. J. R. B. D. I. T. E. S.-I.-. PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA: POTENCIALIDADES DE DIAGNÓSTICO PARA DOENÇAS DE CHAGAS. 2016.

DA SILVA, R. A. J. B. J. O. H. R. Estado atual da vigilância entomológica da doença de Chagas no estado de São Paulo/Current state of the entomological surveillance of Chagas' disease in the state of São Paulo. v. 2, n. 2, p. 742-755, 2019.

DE FUENTES-VICENTE, J. A. et al. What makes an effective Chagas disease vector? Factors underlying Trypanosoma cruzi-triatomine interactions. **Acta Tropica**, v. 183, p. 23-31, Jul 2018.

DE MARCHI, C. R.; AMATO, V.; DE ALMEIDA, I. C. Behavior of the chemiluminescent ELISA method in relation to results considered discordant via three conventional techniques for diagnosing Chagas disease. **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical**, v. 40, n. 1, p. 68-70, Jan-Feb 2007.

DIAS, J. C. P. et al. II Consenso Brasileiro em doença de Chagas, 2015. v. 25, p. 7-86, 2016.

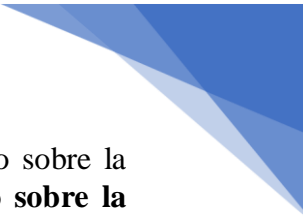
DIAS, J. C. P.; SILVEIRA, A. C.; SCHOFIELD, C. J. J. M. D. I. O. C. The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. v. 97, n. 5, p. 603-612, 2002.

DIAZ-BELLO, Z. et al. A confirmatory diagnosis of antibodies anti-Trypanosoma cruzi in donors referred by blood banks in Venezuela. **Investigacion Clinica**, v. 49, n. 2, p. 141-150, Jun 2008.

FIDALGO, A. et al. Insect vectors of Chagas disease (Trypanosoma cruzi) in Northeastern Brazil. **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical**, v. 51, n. 2, p. 174-182, Mar-Apr 2018.

FOGUEL, M. V. et al. Amperometric Immunosensor for Chagas' Disease Using Gold CD-R Transducer. **Electroanalysis**, v. 23, n. 11, p. 2555-2561, Nov 2011.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. J. R. B. D. E. Visceral leishmaniasis in Brazil: current status, challenges and prospects. v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.



GUHL, F.; LAZDINS-HELDS, J. K. Reporte del grupo de trabajo científico sobre la enfermedad de Chagas. In: (Ed.). **Reporte del grupo de trabajo científico sobre la enfermedad de Chagas**, 2007.

HAJI-HASHEMI, H. et al. Label-free electrochemical immunosensor based on electrodeposited Prussian blue and gold nanoparticles for sensitive detection of citrus bacterial canker disease. **Sensors and Actuators B-Chemical**, v. 275, p. 61-68, Dec 2018.

HAJI-HASHEMI, H. et al. Simple and effective label free electrochemical immunosensor for Fig mosaic virus detection. **Analytical Biochemistry**, v. 566, p. 102-106, Feb 2019.

JAROCKA, U. et al. Electrochemical immunosensor for detection of antibodies against influenza A virus H5N1 in hen serum. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 55, p. 301-306, May 2014.

JIA, H. Y. et al. An Electrochemical Immunosensor Based on Microfluidic Chip for Detection of Chlorpyrifos. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 10, n. 10, p. 8750-8758, Oct 2015.

KRATZ, J. M. et al. Clinical and pharmacological profile of benznidazole for treatment of Chagas disease. **Expert Review of Clinical Pharmacology**, v. 11, n. 10, p. 943-957, 2018.

PAKCHIN, P. S. et al. Electrochemical immunosensor based on chitosan-gold nanoparticle/carbon nanotube as a platform and lactate oxidase as a label for detection of CA125 oncomarker. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 122, p. 68-74, Dec 2018.

PEREZ-AYALA, A. et al. Usefulness of the ARCHITECT Chagas (R) assay as a single test for the diagnosis of chronic Chagas disease. **Tropical Medicine & International Health**, v. 23, n. 6, p. 634-640, Jun 2018.

PINTO, B. F. et al. CD86 Expression by Monocytes Influence an Immunomodulatory Profile in Asymptomatic Patients with Chronic Chagas Disease. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 13, Mar 2018.

RAMOS JR, A. N.; CARVALHO, D. M. D. J. C. D. S. P. Os diferentes significados da certificação conferida ao Brasil como estando livre da doença de Chagas. v. 17, p. 1403-1412, 2001.

REGIART, M. et al. An electrochemical immunosensor for anti-T-cruzi IgM antibodies, a biomarker for congenital Chagas disease, using a screen-printed electrode modified with gold nanoparticles and functionalized with shed acute phase antigen. **Microchimica Acta**, v. 183, n. 3, p. 1203-1210, Mar 2016.

SALOMÃO, P. E. A. J. R., SOCIETY; DEVELOPMENT. Production and Application of Biosensors: A Brief Review. v. 7, n. 3, p. 1373282, 2018.

SANTOS, C. S. et al. Electrochemical Immunosensor for Qualitative Diagnosis of the American Trypanosomiasis Based on Gold Modified with 3-Mercaptopropionic. **Journal of the Electrochemical Society**, v. 163, n. 5, p. B158-B162, 2016.



SCHMUNIS, G. A.; YADON, Z. E. Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problem. **Acta Tropica**, v. 115, n. 1-2, p. 14-21, Jul-Aug 2010.

SCHOFIELD, C. J.; JANNIN, J.; SALVATELLA, R. J. T. I. P. The future of Chagas disease control. v. 22, n. 12, p. 583-588, 2006.

SGUASSERO, Y. et al. Course of serological tests in treated subjects with chronic *Trypanosoma cruzi* infection: A systematic review and meta-analysis of individual participant data. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 73, p. 93-101, Aug 2018.

SHARMA, A. et al. Electrochemical Immunosensor for Staphylococcal Enterotoxin B (SEB) Based on Platinum Nanoparticles-Modified Electrode Using Hydrogen Evolution Inhibition Approach. **Electroanalysis**, v. 26, n. 11, p. 2320-2327, Nov 2014.

STOLF, N. et al. Heart transplantation in patients with Chagas' disease cardiomyopathy. v. 6, n. 5, p. 307-312, 1987.

TAPIA-GARAY, V. et al. Assessing the risk zones of Chagas' disease in Chile, in a world marked by global climatic change. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 1, p. 24-29, Jan 2018.

VARGAS, A. et al. Investigação de surto de doença de Chagas aguda na região extra-amazônica, Rio Grande do Norte, Brasil, 2016. v. 34, p. e00006517, 2018.

XAVIER, S. C. D. et al. Distantiae Transmission of *Trypanosoma cruzi*: A New Epidemiological Feature of Acute Chagas Disease in Brazil. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 5, p. 9, May 2014.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

❖ Desenvolver um dispositivo simples (imunossensor) para detecção rápida de anticorpos de *T. Cruzi* para o diagnóstico da doença de Chagas.

2.2. Objetivos Específicos

❖ Construir uma cela eletroquímica simples com materiais de baixo custo, tendo como eletrodo de trabalho a grafite;

❖ Utilizar métodos eletroquímicos de Voltametria cíclica e Espectroscopia de Impedância eletroquímica para mostrar que cela eletroquímica com eletrodo de trabalho modificado com hemácias sensibilizadas é eficiente em diferenciar soro controle negativo de soro controle positivo que caracterizam a doença de Chagas;

❖ Comparar testes comerciais que caracterizam a doença de Chagas com cela eletroquímica com eletrodo de grafite modificado com hemácias sensibilizadas por antígenos de *T. Cruzi*, utilizando-se da técnica de cronopotenciometria;

❖ Analisar os dados obtidos por cronopotenciometria para a superfície do eletrodo de grafite modificado por hemácias sensibilizadas, a superfície do eletrodo de grafite modificado por hemácias sensibilizadas em contato com controle negativo e a superfície do eletrodo de grafite modificado por hemácias sensibilizadas em contato com controle positivo;

❖ Edificar uma cela eletroquímica rápida e sensível, um sensor eletroquímico inédito para reação de hemaglutinação de anticorpos específicos contra hemácias sensibilizadas para diagnóstico da doença de Chagas.

3. Revisão da Literatura

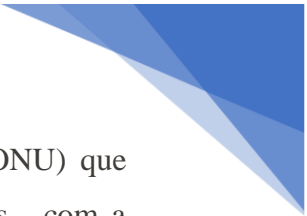
3.1. Doenças Tropicais Negligenciadas

As doenças tropicais negligenciadas são um grupo heterogêneo de doenças transmissíveis, que podem ser causadas por agentes parasitas (helmintos e protozoários), bacterianos, fúngicos, ectoparasitários ou virais, que afetam especialmente as pessoas que vivem na pobreza, sem saneamento apropriado e em contato próximo com vetores infecciosos. Quase um bilhão de pessoas no mundo sofrem de doenças tropicais negligenciadas, que são citadas como “negligenciadas” porque são caracterizadas por escassa atenção dos formuladores de políticas, ausência de prioridade nas estratégias de saúde, pesquisa imprópria e alocação restrita de recursos (CERONE *et al.*, 2019; GARCIA-QUINTANILLA *et al.*, 2019).

As doenças tropicais negligenciadas proporcionam elevada prevalência em regiões entre as latitudes 35° Norte e 35° Sul, com altitudes inferiores a 2.200 metros e temperaturas variando de 15 °C a 40 °C. Três regiões em desenvolvimento (África Subsaariana, Ásia e América Latina), são vulneráveis as doenças tropicais negligenciadas. As implicações diretas das doenças tropicais negligenciadas podem ser observadas na saúde, educação, agricultura e economia dessas regiões (LINDOSO e LINDOSO, 2009).

No Brasil, o Ministério da Saúde definiu como prioridades de atuação que compõem o Programa de Pesquisa e Desenvolvimento em Doenças Negligenciadas, 7 doenças que são elas: dengue, esquistossomose, hanseníase, leishmaniose visceral e tegumentar, malária, tuberculose e doença de Chagas (INÁCIO *et al.*, 2019).

Doenças como as leishmanioses, a tuberculose, a dengue e a hanseníase acontecem em praticamente todo o território do Brasil (BOSCH *et al.*, 2017; MONTALVO *et al.*, 2017; CONNERS *et al.*, 2018; TIWARI *et al.*, 2018). As regiões norte e nordeste exibem o menor Índice de Desenvolvimento Humano (LEITE *et al.*, 2017) e reúnem a maior incidência das doenças negligenciadas (VIGILATO *et al.*, 2013; DOS REIS *et al.*, 2017). Exemplos são, a malária e doença de Chagas com 90% (LINDOSO e LINDOSO, 2009) e 91,1% (MS, 2015), respectivamente, dos casos ocorrem na região norte.



Uma resposta global veio com Organização das Nações Unidas (ONU) que abraçou oito Objetivos de Desenvolvimento do Milênio (ODM) e 18 metas , com a finalidade de erradicar a fome, a pobreza e outras dificuldades sociais, abrangendo as doenças negligenciadas (INÁCIO *et al.*, 2019), que são passíveis de amplo controle, eliminação ou erradicação por meio de tratamento em massa, gestão de casos intensificada ou inovadora, controle de vetores ou saúde pública veterinária; e são relativamente negligenciados pela pesquisa. A Organização Mundial da Saúde (OMS) reconhece 20 doenças que atendem a esses critérios (Tabela 1) (BODIMEADE *et al.*, 2019).

Os programas de doenças tropicais negligenciadas se beneficiam de alguns dos maiores programas de doação farmacêutica já feitos. Várias empresas farmacêuticas concordaram em doar suprimentos ilimitados de medicamentos durante o tempo necessário para apoiar programas globais. Essas doações, apoiadas por fundos substanciais para a implementação de parceiros, incluindo o Departamento de Desenvolvimento Internacional do Reino Unido, permitiram que progressos substanciais fossem feitos na redução da morbidade dessas condições. Apesar deste progresso, permanecem desafios consideráveis no controle, eliminação e erradicação de doenças tropicais negligenciadas (BODIMEADE *et al.*, 2019). Como por exemplos, malária, Chagas e filariose, recebem menos de 3% do investimento de laboratórios em pesquisa e desenvolvimento. Apesar disso, afetam 90% da população mundial (DA SILVA *et al.*, 2019).

Um fato extraordinário para a pesquisa e o desenvolvimento de medicamentos em parasitologia teve uma inspiração para que novas descobertas sejam feitas (CHIPOLINE e PACHECO, 2016). O importante Prêmio Nobel de Medicina foi concedido a cientistas que pesquisam sobre verminoses e malária, doenças que afetam pessoas em condição de pobreza(CHIPOLINE e PACHECO, 2016). São eles os laureados:

William C. Campbell – nasceu em 1930 em Ramelton, Irlanda. Depois de receber um BA da Trinity College, Universidade de Dublin, Irlanda, em 1952, ele recebeu um PhD da Universidade de Wisconsin, Madison, WI, EUA, em 1957. De 1957-1990, ele estava com o Instituto de Pesquisa Merck Terapêutico, a partir de 1984-1990 como cientista sênior e diretor de Ensaio de Investigação e Desenvolvimento. Campbell é atualmente emérito Research Fellow da Universidade de Drew, Madison, New Jersey, EUA (CHIPOLINE e PACHECO, 2016).

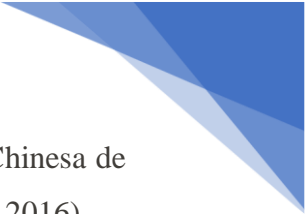
Tabela 1. As 20 doenças tropicais negligenciadas segundo a Organização Mundial da Saúde.

	Doenças tropicais negligenciadas	Estratégia de controle	Meta de eliminação
1	Esquistossomose	AMM (praziquantel), saneamento, controle de caracóis	Sim (na China)
2	Oncocercose	AMM (ivermectina), controle vetorial	Sim (nas Américas)
3	Filariose Linfática	AMM (ivermectina, albendazol), controle de vetores	Sim
4	Tracoma	AMM (azitromicina), água, saneamento, educação	Sim
5	Bouba	AMM (azitromicina)	Sim - erradicação
6	Helmintos transmitidos pelo solo	AMM (albendazol)	Não
7	Verme da Guiné	Água potável, saúde e educação	Sim - erradicação
8	Tripanossomíase africana	Localização e tratamento de casos, controle de vetores	Sim (para Trypanosoma brucei gambiense)
9	Leishmaniose Visceral	Caso encontrado e tratamento	Sim (subcontinente)
10	Lepra	Localização e tratamento de caso	Sim
11	Tênia / cisticercose	Saneamento, inspeção de carne, vacinação de suínos	Não
12	Equinococose	Controle de matadouro, tratamento de cães, educação	Não
13	Trematódeos de origem alimentar	Tratamento de ovelha, educação de saúde	Não
14	Úlcera de Buruli	Localização e tratamento de casos	Não
15	Raiva	Vacinação de cães, educação de saúde	Não
16	Dengue e chikungunya	Controle de vetores	Não
17	Micetoma	Localização de casos e tratamento	Não
18	Sarna	Ainda não definido possivelmente (ivermectina)	Não
19	Mordida de cobra	Ainda não definido	Não
20	Doença de Chagas	Controle de vetores, triagem de sangue	Sim (alguns países)

AMM = administração em massa de medicamentos.

Satochi Omura – é um bioquímico japonês e nasceu em 1935 na província de Yamanashi, Japão. Recebeu um PhD em Ciências Farmacêuticas em 1968 na Universidade de Tóquio, Japão e outro PhD em Química em 1970 na Universidade de Ciência de Tóquio. Foi pesquisador do Instituto Kitasato, Japão de 1965-1971 e professor na Universidade de Kitasato, Japão entre 1975-2007. Desde 2007, Satoshi Omura é professor emérito na Universidade de Kitasato (CHIPOLINE e PACHECO, 2016).

Touyou Tu – é uma farmacologista chinesa e nasceu em 1930 na cidade Ningbo, China. Graduou-se em farmácia na Universidade Medicinal de Pequim em 1955. Foi professora assistente na Academia de Medicina Tradicional Chinesa na China (1965-1978), professora associada (1979-1984) e em 1985 tornou-se professora efetiva no mesmo



Instituto. Desde então trabalha no Instituto de Matéria Médica da Academia Chinesa de Medicina Tradicional Chinesa, onde é professora (CHIPOLINE e PACHECO, 2016).

3.2. Doença de Chagas – Aspectos Gerais

3.2.1 Transmissão Vetorial

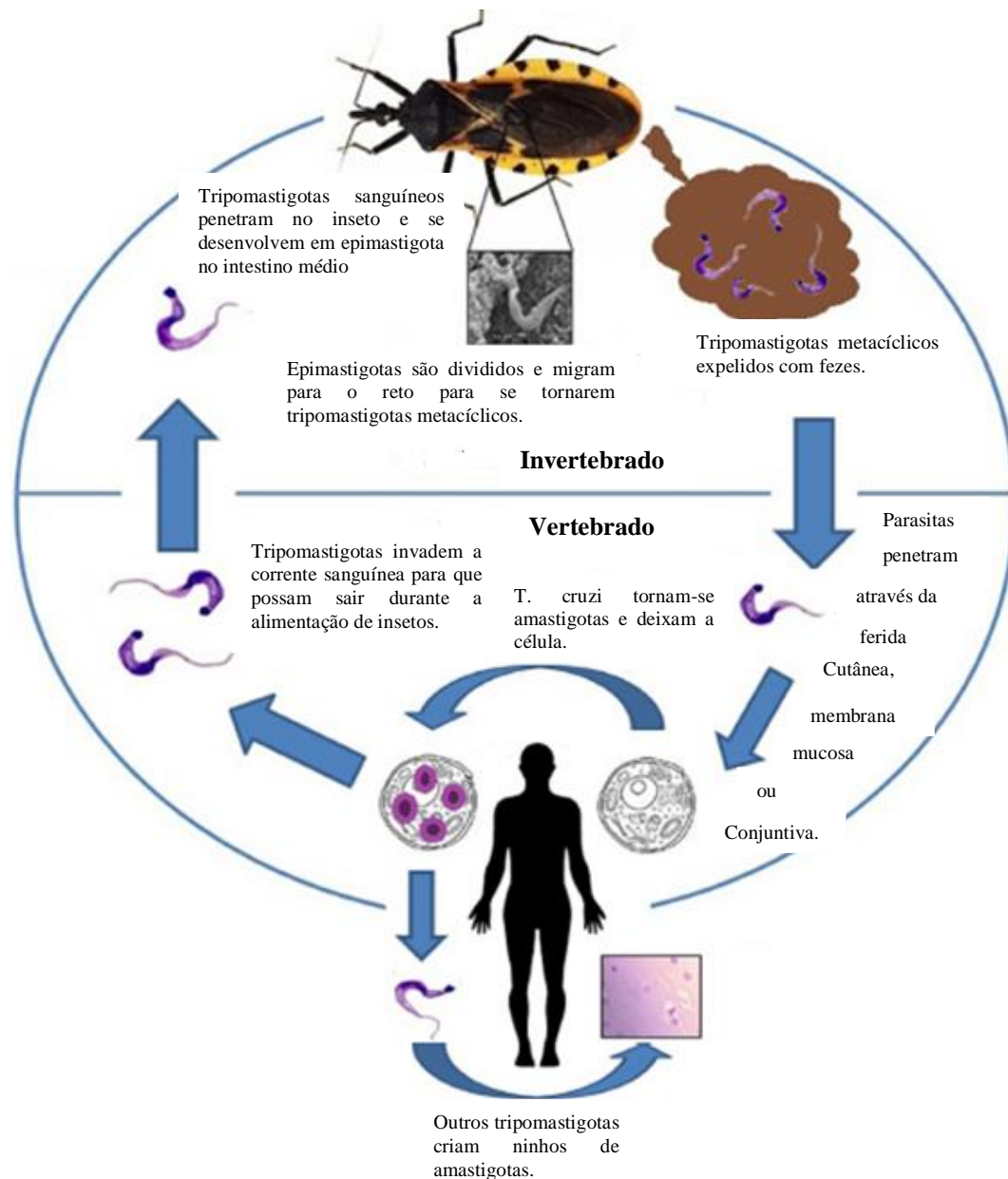
Há mais de um século, o biólogo e médico sanitarista Carlos Justiniano Ribeiro Chagas, um marco histórico em 1909, com a tripla descoberta, onde o cientista mineiro descobriu não apenas o vetor (inseto conhecido popularmente como barbeiro – gênero *Triatoma*) e o agente etiológico da doença (o protozoário *Trypanosoma cruzi*) Figura 1, como ainda descreveu a patologia da mesma. O *T. cruzi*, um protozoário unicelular e parasita obrigatório pertencente à ordem Kinetoplastidae, sendo tipificado de forma vasta e completa por este pesquisador. O nome foi dado em homenagem a Oswaldo Gonçalves Cruz, também médico sanitarista e cientista, que foi pioneiro nos estudos de moléstias tropicais e que desenvolveu relevantes estudos acerca da diversidade de doenças parasitárias no Brasil. Posteriormente, a moléstia infecciosa recém descoberta foi denominada de Doença de Chagas em tributo ao pesquisador descobridor da enfermidade (MALAFAIA e RODRIGUES, 2010; DA SILVA *et al.*, 2019).

Antropozoonose de importância expressiva, a Doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana, retrata uma classe infecciosa que possui fase aguda, indeterminada ou latente e crônica, e que tem consistido e referida como doença parasitária de ampla importância para a saúde pública (MONTANARO *et al.*, 2016; BEZERRA *et al.*, 2017; ZUMA *et al.*, 2017; DA SILVA *et al.*, 2019). Apesar do enorme impacto no campo social e econômico, para OMS (Organização Mundial de Saúde), a Doença de Chagas permanece sendo uma patologia tropical negligenciada pelos órgãos de saúde de países em que ela é endêmica (AMARAL *et al.*, 2019; SOBRAL FILHO, 2019).

A transmissão vetorial é um fato que está diretamente unido às transformações ambientais provocadas pelo o homem e que beneficiam à proliferação vetorial, como também está ligado a situação econômica da população e às características dos vetores. As principais localidades em que a população proporciona vulnerabilidade são as zonas

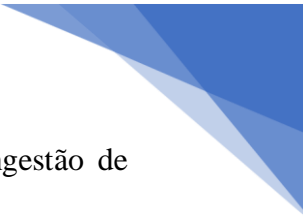
rurais, pois as áreas silvestres proporcionam maior interação entre o ser humano e os vetores.

Figura 1. Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* que inclui hospedeiros triatomíneos e vertebrados.



Fonte adaptada (DE FUENTES-VICENTE *et al.*, 2018)

A tripanossomíase americana pode ser transmitida por numerosos mecanismos, porém em 80% dos casos, ela ocorre através do próprio vetor, o hemíptero hematófago, pertencentes à subfamília Triatominae. Apesar de o *T. Cruzi* seja transmitido para humanos especialmente por insetos vetores, a infecção pode acontecer através de



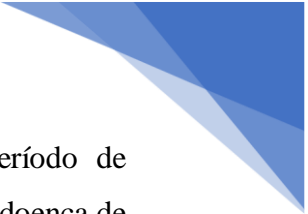
transfusão de sangue, transplante de órgãos, transferência materna e / ou ingestão de alimentos contaminados (GUHL, 2009).

Embora o uso alimentar hematófago difundido (VELASQUEZ-ORTIZ *et al.*, 2019), os triatomíneos têm a aptidão de cultivar outras fontes alimentares, como insetos (GONZALEZ-LINARES *et al.*, 2019) e plantas (DONOSO *et al.*, 2016). Até o momento, mais de 150 espécies de triatomíneos foram expostas com proeminências baseadas de espécies que transportam o parasita por mais da metade (GURGEL-GONCALVES *et al.*, 2017). Os triatomíneos contraem o parasita (forma tripomastigota do sangue) quando se alimentam do sangue de um hospedeiro vertebrado contaminado, então os parasitas diferem em epimastigotas e se dividem no intestino médio posterior (CARDOSO *et al.*, 2016; FONSECA-OLIVEIRA *et al.*, 2018). Subsequentemente, as epimastigotas migram para o reto para virarem tripomastigotas metacíclicos que são ejetados nas fezes. Ao grau que os insetos se alimentam, eles evacuam na pele do hospedeiro e o parasita pode entrar por meio da lesão na pele, mucosa ou conjuntiva (ver ciclo de vida do *T. cruzi* na Figura 1) (CORONADO *et al.*, 2006; KUEHN *et al.*, 2014). Estudos revelam que não apenas os tripomastigotas metacíclicos são infectantes para o hospedeiro vertebrado, mas epimastigotas recentemente diferenciadas (rdEpi) também têm disposição para infecção (KESSLER *et al.*, 2017). Isso aponta que mais estudos são necessários para conhecer muitos aspectos da biologia do parasita em seus vetores.

É importante destacar que apesar de o Brasil em 2006 ter recebido a certificação de controle do *Triatoma infestans* (FERREIRA e SILVA, 2006), o acontecimento de menor mobilização populacional em relação as medidas preventivas pela falsa confiança de resolução terminante da problemática em questão. Outro importante episódio em implicação do maior controle da transmissão vetorial foi notado em relação a dois outros estilos de transmissão que foram intensamente impactadas, a transmissão por hemoderivados e a transplacentária ou vertical, que passaram a oferecer maior visibilidade e número de fatos notificados (NICOLETTI e DA SILVA, 2014).

3.2.2. Transmissão Transfusional

A comunicação que a doença de Chagas ocorreria também através da transfusão de sangue foi abordada em 1936 na Argentina (MAZZA *et al.*, 1936) e sua confirmação foi feita no Brasil em 1952 (FREITAS *et al.*, 1952).



A migração no sentido zona rural – zona urbana, devido ao período de industrialização do Brasil, na década de cinquenta, aumentou a urbanização da doença de Chagas em que consistiu em alta prevalência de doadores chagásicos nos bancos de sangue do país, abrangendo índices de cerca 10% (SCHMUNIS, G., 1991). Quadro semelhante foi notado gradualmente em todos os países endêmicos (SCHMUNIS, 1997).

A elevada prevalência de sujeitos chagásicos nas zonas urbanas e a inexistência de programas de controle, fez com que a transmissão transfusional, isso inclui secreções e hemoderivados contaminados com o protozoário (DIAS, J. V. L. *et al.*, 2016), do *T. Cruzi* fosse responsável, na década de setenta, por cerca 20 mil casos anuais novos da doença exclusivamente no Brasil (SCHMUNIS, G. J. T., 1991).

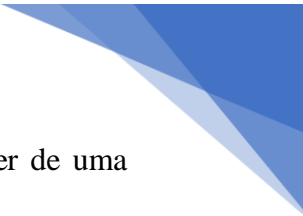
A propagação da tripanossomíase americana por meio de hemoderivados é considerada como segunda rota de transmissão mais importante do ciclo do *T. Cruzi*. Dessa forma, cerca de 5 a 20% dos eventos da doença se propaga por meio dessa via (DE BARROS VASCONCELOS *et al.*, 2013).

Com controle da transmissão vetorial, de forma parcial ou de forma completa, em países comprovadamente endêmicos, a transfusão de sangue passou a ser o mecanismo básico de dispersão da doença nestas áreas ao decorrer das décadas de 80 e 90 (SCHMUNIS, G. J. T., 1991).

O planejamento dos órgãos governamentais de saúde passou a desenvolver adequados controle e seleção ativa dos possíveis doadores e receptores de sangue. Importante destacar que várias condições podem proporcionar a possibilidade de contágio por essa via, como por exemplo a existência do parasita no constituinte sanguíneo doado, redução da imunidade do sujeito receptor, um bom aparato de triagem dos doadores, eficácia da sorologia efetivada aos candidatos à doação sanguínea, dentre outros (DIAS, J. V. L. *et al.*, 2016).

3.2.3. Transmissão Congênita

A Organização Mundial de Saúde (OMS) destaca que pelo menos dois milhões de mulheres em idade fértil encontrar-se cronicamente contaminadas com o *Trypanosoma cruzi* na América Latina, com a incidência de contaminação congênita sendo pelo menos 15.000,00 casos / ano (SALUD, 2006). A transmissão materno-fetal pode ser frequente



em cada gravidez (agrupamento familiar de casos congênitos) e pode ocorrer de uma geração para outra (transmissão vertical) (CARLIER e TRUYENS, 2010).


Em muitos casos, a transmissão congênita não proporciona sinais e sintomas manifestos, dessa forma, a criança irá desenvolver depois a doença de Chagas crônica. Entretanto, ao ganhar o tratamento de forma precoce e apropriado, a criança tem boas oportunidades de cura cerca de 90%. assim, dois expressivos atos em saúde pública é a realização do diagnóstico precoce e terapia de medicamentos eficaz no primeiro ano de vida (PINTO *et al.*, 2013; CARLIER *et al.*, 2015).

Sendo um problema de saúde pública a transmissão congênita da doença de Chagas, pode ter subnotificação por falta de triagem pré-natal, assim, a despeito das pesquisas assinalarem uma transmissão perinatal do *T. Cruzi* em torno dos 20%, recomendando baixa prevalência deste modo de transmissão, os motivos para o baixo índice são aparentemente esclarecidos, o que pode nos induzir a refletir em um cenário de escasso estudo em relação ao assunto e na subnotificação. No Brasil, sem embargo da existência de diversas pesquisas na área, o índice de transmissão não chegou a 1%, apresentando-se muito inferior à indecência ocorrida em países da América Latina (LUQUETTI *et al.*, 2015).

3.2.4. Transmissão Acidental

No Brasil e no exterior 50 casos foram contabilizados na década de 80 como transmissão acidental (DE CHAGAS, 1997). Não tão frequente quanto as demais transmissões, devido algumas circunstâncias, como insegurança, desaparecimento ou inaptidão técnica do serviço ou pesquisador em questão; o próprio acidentado pode ocultar ou negar a ocorrência do acidente; assim como é bastante comum uma fase aguda clinicamente pouco expressiva ou mesmo não aparente, problematizando a suspeição clínica e o próprio diagnóstico (NETO *et al.*, 2000).

Diversas circunstâncias de acidentes são possíveis, seja em laboratórios de triatomíneos, seja na captura do vetor em áreas endêmicas, ou em trabalhos experimentais com mamíferos infectados, culturas ou em aerossóis de materiais infectados. Relatos de infecção cirúrgica a partir de pacientes na fase aguda, além de carências de segurança no transporte de materiais infectados (NETO *et al.*, 2000; DIAS *et al.*, 2011; NETO, 2012).



Os fatores de risco passam por desconhecimento, desatenção, falta ou mal-uso de equipamentos de proteção individual, instalações e equipamentos inadequados, iluminação deficiente, falta de capacitação ou participação de outros motivos facilitadores (NETO *et al.*, 2000)

Para maior propriedade dessa via de transmissão do *T. cruzi*, é formidável que tenha fortalecimento do procedimento de prevenção em saúde, incremento de ações voltadas para a habilitação e explicação profissional sobre a forma certa de manipulação durante os estudos com esse protozoário, como também a disponibilidade dos equipamentos de proteção individual (EPI) e equipamentos de proteção coletivo (EPC), assim como os programas do uso adequado dos próprios (DIAS, J. V. L. *et al.*, 2016).

3.2.5. Transmissão Sexual

Trata-se de possibilidade remota de transmissão da doença de Chagas, estudos com animais, por exemplo cadelas ou roedores suscetíveis por via vaginal com sêmen infectado (NETO *et al.*, 2000; ARAUJO *et al.*, 2017). No ser humano, há suspeita de contágio de homens suscetíveis com mulheres infectadas, durante a menstruação (NETO *et al.*, 2000). Essas probabilidades acrescentam muito a partir de sujeitos com elevada parasitemia necessita-se então indicar abstinência sexual (NETO *et al.*, 2000).

Segundo Araújo *et al.* (2017), a transmissão sexual do *T. cruzi* pode elucidar muitos eventos da doença de Chagas em países não endêmicos, especialmente quando não há proeminência da transmissão pelo vetor ou por outras formas de contaminação. Ele ainda destaca que as espécies animais mostram que a transmissão sexual é possível, pelo fato do *T. cruzi* se alojar em órgãos de reprodução de machos e fêmeas e essas estruturas proporcionarem um microambiente adequado para o desenvolvimento de seu ciclo biológico. Isso só é possível graças ao privilégio imunológico que o sistema reprodutor dos animais possui, o que deixa o protozoário protegido de um suposto ataque do sistema imunológico do animal, permitindo a sobrevivência e propagação desse microrganismo por essa via (GOMES, C. *et al.*, 2019).

3.2.6. Transmissão Oral


O Ministério da Saúde do Brasil, registrou 1.034,00 casos de doença de Chagas aguda por via oral no período de 2000 a 2013 (SANTOS *et al.*, 2018).

Na totalidade epidemiológico dos fatos relatados de Doença de Chagas no Brasil por transmissão oral, uma parte abundante dos fatos tem sido comprovada na região extra-amazônica, e a maior parte ficou conexa à ingestão do caldo de cana de açúcar e especialmente pelo suco do açaí processado artesanalmente. Assim, a transmissão oral da doença tem sido notada em diferentes estados brasileiros como a Bahia, Ceará, Piauí, Santa Catarina e São Paulo e com maior presença de casos e surtos apontados nos Estados da Amazônia Legal: Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Amapá, Pará e Tocantins (SAÚDE., 2009). Sendo admitidos também em regiões próximas da Amazônia como na cidade de Antioquia na Colômbia com 156 casos de Doença de Chagas, dos quais 10 (6,4%) pacientes infectados por transmissão oral, devido ao consumo de alimentos contaminados com fezes de marsupiais, levando um paciente a óbito (RÍOS *et al.*, 2011).

Esta transmissão também pode acontecer por meio do consumo de carne crua ou malcozida de caças, como tatu por exemplo, por alimentos corrompidos por urina ou fezes de marsupiais infectados, ou mesmo por meio de hábitos selvagens de ingestão de triatomíneos. Outro fator ressaltante é que fezes de triatomíneos podem continuar algumas horas com as formas infectantes do parasito em atmosfera com elevada umidade, assim podendo indiretamente contagiar alimentos através de patas e aparelho bucal de carreadores secundários, como moscas e baratas (SAÚDE., 2009).

Em alimentos como o leite, caldo de cana ou suco do açaí, conservados à temperatura ambiente, o parasito pode conservar viável por vinte e quatro horas ou mais. Embora o suco gástrico dos vertebrados superiores tenha a disposição de destruir muitos parasitos, certa magnitude deste protozoário é capaz de evadir-se deste ato, mediante mecanismos químicos de proteção externa, o que permite sua penetração através da mucosa intestinal (SAÚDE., 2009).

Averiguações experimentais em nível molecular evidenciaram que formas infectantes tripomastigotas metacíclicas podem invadir e replicar-se no epitélio da mucosa gástrica, onde se desconfiam que possam conseguir esse epitélio o qual se torna a porta de entrada para a infecção sistemática do T. *Cruzi* após o provocação oral (YOSHIDA, 2009). Pesquisas experimentais têm apontado que quando T. *Cruzi* é



embutido abertamente no estômago de camundongos por meio de intubação, os animais desenvolvem a doença com lesões tão intensas que são semelhantes às adquiridas pelos animais infectados intraperitonealmente (CAMANDAROBÁ *et al.*, 2002).

O controle das vias principais da doença de Chagas, tais como, vetorial, transfusão sanguínea e etc. Os 62% dos casos de doença de Chagas registrados no Brasil foi através de alimentos contaminados. Estudos mostram surtos da doença com manifestações agudas com estreita relação ao consumo de alimentos sabidamente contaminados pelo protozoário. Outros países da América do Sul também notaram eventos agudos da doença de Chagas causado pela ingestão de alimentos e insumos contaminados com o *T. cruzi*. (MAGALHÃES-SANTOS, 2015; SANGENIS *et al.*, 2016).


É importante adotar que prevenir a transmissão oral da Doença de Chagas é uma empreitada difícil, pelo caso destes surtos serem casos pontuais e aleatórios e incontestavelmente mais prevalentes na Amazônia Brasileira. Apesar que na Bahia tenha oferecido baixo percentual de eventos de transmissão oral da doença, o seu índice de mortalidade foi o segundo mais alto em relação ao estado do Pará o qual foi mais prevalente em surtos. Estes elementos sugerem que o índice de mortalidade por contágio oral independe do número de eventos notificados e, logo, deve haver uma relação com a virulência e patogenicidade das cepas ativas. Por isso, é formidável chamar o bom emprego para algumas táticas de higiene as quais podem prevenir novos surtos agudos da doença, como por exemplo, pôr critérios de triagem dos alimentos que podem transportar o parasito, tratar e cozinhar adequadamente as carnes (caças) nativas de áreas endêmicas ou mesmo consumir sucos de açaí prudentemente pasteurizados e caldo de cana proveniente de ambientes devidamente higienizados (MAGALHÃES-SANTOS, 2015).

3.2.7. Condições Clínicas para Doença de Chagas

3.2.7.1. Fase Aguda

O período de incubação da fase aguda é de uma a duas semanas, apesar do evento de infecção por transfusão ou transplante, possa ser de até quatro meses (BERN, 2015; BESTETTI *et al.*, 2015; PELLEGRINI *et al.*, 2015).

A fase aguda da infecção pelo *T. cruzi* dura de 8 a 12 semanas e é decorrente do parasito e da resposta imune que produz, especialmente as citocinas do tipo Th1. Ocorre



principalmente em crianças com menos de 12 anos de idade, a maioria delas despercebida devido à leveza e à natureza inespecífica da imagem (BERN, 2015).

Nos eventos transmitidos por vetor, a fase aguda é marcada por parasitemia circulante detectável no sangue periférico e falta de sintomas na maioria dos fatos. Se os sintomas aparecem, eles geralmente são inespecíficos e leves. Em 5% dos casos, a primeira manifestação é o chagoma, que é uma lesão eritematosa e endurecida, comumente indolor, no local de entrada do parasita após sua picada e que é o efeito da propagação de formas amastigotas do parasita, dentro dos macrófagos locais. Se a entrada atinge a parte conjuntiva, há um edema periorbital, unilateral e indolor conhecido como o sinal de Romana. Raramente <1% e em crianças muito pequenas, pode ocorrer miocardite, derrame pericárdico e/ou meningoencefalite (MAGUIRE JH. GORBACH S, 2004; MOREIRA *et al.*, 2018). A possibilidade de morte nessa fase está relacionada à idade, sendo maior em crianças 2-7% dos sujeitos morrem na fase aguda (ROSAS F VD, 2011).

Em episódio de transmissão vertical, 65% continuam assintomáticos. O restante pode ocorrer hepatoesplenomegalia, hepatite, sepse, meningite, miocardite ou anemia hemolítica. Podem também ter prematuridade, baixo peso ao nascer, baixo Apgar, aborto ou placentite (RASSI A JR, 2010).

A contágio pelo *T. cruzi* por via oral parece estar associada a uma grande morbidade aguda e maior taxa de mortalidade que o contágio transmitida por vetores (DIAZ *et al.*, 2015; BRANDAO *et al.*, 2017; DE ALBUQUERQUE *et al.*, 2018).

Na contaminação adquirida por transfusão sanguínea, apesar da elevada parasitemia inicial, os sintomas agudos são muito raro (COURA, 2007; SCHMUNIS e YADON, 2010; ROJO-MEDINA *et al.*, 2018).

Assim fase aguda pode apresentar manifestações que incluem febre, mialgias, miocardiopatia, mal-estar, linfadenopatia, dores musculares, sudorese, hepatoesplenomegalia, parasitemia, derrame pericárdico e, menos frequentemente, meningoencefalite. O pseudocisto é formado após a multiplicação intracelular do parasito nos músculos e nas células do retículo endotelial (COURA e BORGES-PEREIRA, 2010; STANAWAY e ROTH, 2015).

3.2.7.2. Fase Latente ou Indeterminada

O estágio indeterminado também conhecido como latente é assintomático, com duração aproximada de 10 a 30 anos (CAROD-ARTAL *et al.*, 2003), podendo persistir por toda a vida, sem sinais físicos ou evidências clínicas de envolvimento de órgãos. No entanto, eles apresentam um grau cardíaco subclínico quando testados por Holter (SANTOS *et al.*, 2014) e ecocardiograma (BARROS *et al.*, 2001).

A fase indeterminada da doença, a mais prevalente e que tem ampla importância do ponto de vista epidemiológico. 20-30% dos pacientes com a forma indeterminada da doença de Chagas progridem após um período de décadas para uma manifestação clínica clara da doença (RODRIGUES-DOS-SANTOS *et al.*, 2018).

Em pacientes imunossuprimidos, há uma ampliação abundante na parasitemia, que pode levar a sérias implicações, como meningoencefalite ou miocardite aguda. Em doentes com Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida (SIDA), a implicação mais corriqueira é meningoencefalite abscesso cerebral, conhecido como "chagoma cerebral" e apresenta-se como uma singular lesão subcortical análogo à que está presente na toxoplasmose cerebral uma massa branca (PY, 2011; RIGANTI *et al.*, 2012).

3.2.7.3. Fase Crônica

A doença pode evoluir para a fase crônica com manifestações, sintomas e sinais físicos de arritmias cardíacas, e tromboembolismo arterial ou venoso, além de degeneração do gânglio, células do sistema nervoso periférico e central, hipertrofia e dilatação de alguns órgãos como esôfago e cólon (OLIVEIRA *et al.*, 2011; BESTETTI *et al.*, 2016; CHEVILLARD *et al.*, 2018; DE ANDRADE *et al.*, 2018; HERNANDEZ *et al.*, 2018).

20-40% dos pacientes contaminados desenvolverão sintomas 10-30 anos depois ao contágio. Em uma baixa percentualidade de pacientes 5-10% pode possuir uma progressão direta da fase aguda para a fase crônica (RASSI A JR, 2010).

Importante destacar que pessoas com contágio crônica por *T. Cruzi* são apropriados de transmitir o parasita para o inseto vetor e também diretamente para outros seres humanos via sangue, doação de órgãos ou transplacentariamente, mesmo quando



não há aparições clínica (MAGUIRE JH. GORBACH S, 2004.; DAMASCENO *et al.*, 2014).

O envolvimento orgânico acontece na configuração de cardiomiopatia (14-45%), aparições gastrointestinais (10-21%) ou as duas (10%). Menos de 5% desenvolverão sintomas de envolvimento do sistema nervoso periférico (MAGUIRE JH. GORBACH S, 2004.).

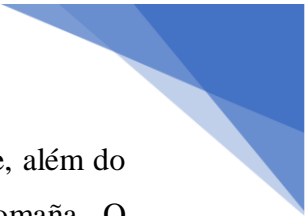
Pacientes imunossuprimidos podem reativar o contágio crônico com manifestações como miocardite aguda, meningoencefalite e / ou abscessos cerebrais, paniculite e lesões de pele (BERN, 2015).

3.2.8. Diagnóstico

O diagnóstico etiológico de *T. Cruzi* é decisivo e fundamental, a partir de informações laboratoriais, devido os pacientes com sorologia positiva possam não desenvolver evidência clínica de doença crônica, apenas uma pequena minoria de indivíduos é capaz de desenvolver o quadro clínico do *T. Cruzi* (APT, WERNER, HEITMANN, INGRID, JERCIC, L, ISABEL, M, JOFRÉ, LEONOR, NOEMÍ, ISABEL, SAN MARTIN, V, *et al.*, 2008; APT, WERNER, HEITMANN, INGRID, JERCIC, L, ISABEL, M, JOFRÉ, LEONOR, NOEMÍ, ISABEL, SAN MARTÍN, V, *et al.*, 2008; APT, WERNER, HEITMANN, INGRID, JERCIC, L, ISABEL, M, JOTRÉ, LEONOR, *et al.*, 2008; APT, W. *et al.*, 2008; BALOUZ, MELLI, *et al.*, 2017; KRATZ *et al.*, 2018).

Os mecanismos envolvidos no desenvolvimento de formas graves da doença de Chagas não são dominados em sua totalidade. Pesquisas destacam fatores importantes na progressão da doença: genética do hospedeiro, características do parasito e resposta imune do hospedeiro (MENDES, T. A. D. *et al.*, 2013; LEWIS *et al.*, 2016; DECOTE-RICARDO *et al.*, 2017; DE FUENTES-VICENTE *et al.*, 2018; PINTO *et al.*, 2018).

É recomendado solicitar exames diagnósticos em todos os pacientes de áreas endêmicas com um conjunto epidemiológico apropriado (tendo vivido em área endêmica, biografia materna de doença de Chagas, transfusão sanguínea sem triagem para doença de Chagas). Analisar-se que uma pessoa tem contaminação por *T. cruzi* quando oferece um histórico epidemiológico ajustado e análises laboratoriais com resultados positivos (PINAZO *et al.*, 2014; GRANJON *et al.*, 2016; NIBORSKI *et al.*, 2016).



O diagnóstico de doença aguda deve ser respeitado em pacientes que, além do divulgado, oferecem descobertas clínicas como Chagoma ou sinal de Romaña. O diagnóstico de doença crônica deve ser estimado, além do divulgado, se possuir técnicas de triagem com sorologias positivas e sintomas clínicos ajustados, como cardiomiopatia ou aparições de doença esofágica (HERNANDEZ *et al.*, 2018; ROJO-MEDINA *et al.*, 2018; ZOLLER *et al.*, 2019).

A confirmação da fase aguda pode ser bancada por esfregaço de sangue ou Reação em cadeia da polimerase (PCR). A técnica de confirmação da fase crônica é a sorologia. Para analisar o implicação de órgãos, um eletrocardiograma ou exames de imagem como radiografia, ecocardiografia ou ressonância magnética podem ser realizados (MURCIA *et al.*, 2016; DE SOUZA *et al.*, 2018; SA *et al.*, 2018; ZREIN *et al.*, 2018).


O diagnóstico da doença de Chagas pode ser realizado por:

3.2.8.1. Detecção Direta do Parasita

Analisa-se como selo diagnóstico da fase aguda a presença do *T. Cruzi* no sangue e outros líquidos orgânicos (NAVARRETE-SANDOVAL e SERVIN-ROJAS, 2016; BALOUZ, AGUERO, *et al.*, 2017; EGUEZ *et al.*, 2017). O exame complementar característico que deve ser utilizado para o diagnóstico da fase aguda incide, basicamente, no esclarecimento do *T. Cruzi* no sangue periférico (análise direta), através de exame de sangue fresco, gota espessa ou pelo procedimento de concentração de Strout (PINTO, A. Y. D. *et al.*, 2008; DE SOUZA *et al.*, 2013).

A detecção direta é alcançada por visualização microscópica do parasita em uma extensão do sangue periférico, microhematócrito, hemocultura em meio individualizado, xenodiagnóstico ou PCR (ANDRADE *et al.*, 2011).

Essas técnicas só são úteis na fase aguda, quando há maior quantidade de tripomastigotas em circulação no sangue. Porque nos primeiros 10 dias a partir da contaminação, o resultado comumente é negativo, devido não ter tempo para uma multiplicação satisfatória dos parasitos. Por outro lado, após 30 dias do início dos sintomas, o número de parasitos circulantes decresce, graças à imunidade que se estabelece (Coura e Borges-Pereira, 2012; Rassi e Rassi Junior, 2013; Matsuda *et al.*,



2014). É importante destacar que sujeitos imunocomprometidos na fase crônica podem ter excitações e, portanto, métodos de detecção direta de parasitas são os métodos diagnósticos de escolha (BRONFEN *et al.*, 1989; SILVA *et al.*, 1993; PANAMEÑO PINEDA *et al.*, 1998; AGRELO, 2006; DIAS, J. C. P., RAMOS JR, A. N., GONTIJO, E. D., LUQUETTI, A., SHIKANAI-YASUDA, M. A., COURA, J. R., TORRES, R. M., MELO, J. R. D. C., ALMEIDA, E. A. D. e OLIVEIRA JR, W. D., 2016).

As técnicas de PCR, normalmente, mostram resultados positivos dias ou semanas antes que os tripomastigotas circulantes sejam confirmados em manifestações de sangue periférico (SCHIJMAN *et al.*, 2000; DE FÁTIMA OLIVEIRA *et al.*, 2008; DIAS, J. C. P., RAMOS JR, A. N., GONTIJO, E. D., LUQUETTI, A., SHIKANAI-YASUDA, M. A., COURA, J. R., TORRES, R. M., MELO, J. R. D. C., ALMEIDA, E. A. D. e OLIVEIRA JR, W. D. J. E. E. S. D. S., 2016).


As características do paciente, os primers a serem utilizados, e os métodos são impecáveis para diagnóstico útil por PCR para fase crônica da doença de Chagas, devido apresentar sensibilidade variável (JUNQUEIRA *et al.*, 1996; PORTELA-LINDOSO, ANA ANGÉLICA BULCÃO e SHIKANAI-YASUDA, MARIA APARECIDA %J REVISTA DE SAUDE PUBLICA, 2003; TRUCCOLO *et al.*, 2013)

A hemocultura ou xenodiagnóstico indica infecção do parasita de forma direta, apesar de sensibilidade dessas técnicas na infecção crônica o valor é menor que 50% (HOFF *et al.*, 1979; LUZ, 1999; PORTELA-LINDOSO, ANA ANGÉLICA BULCÃO e SHIKANAI-YASUDA, MARIA APARECIDA %J REVISTA DE SAÚDE PÚBLICA, 2003; BRANDÃO, 2013).

Outros métodos utilizados para o diagnóstico específico, na fase aguda da doença de Chagas, são compostos por: biópsia da lesão cutânea tida como chagoma, de linfonodo satélite e de músculo esquelético; xenodiagnóstico com exame precoce dos triatomíneos (sexto ao décimo dia após o repasto) (COURA e BORGES-PEREIRA, 2012; RASSI e MARIN-NETO, 2015)

3.2.8.2. Detecção Indireta do Parasita

Uma suposição clínica de tripanossomíase é imprescindível recorrer à confirmação diagnóstica da doença. Assim, os procedimentos laboratoriais são de extraordinária importância para um diagnóstico apropriado. Porém, os procedimentos de diagnóstico laboratorial podem proporcionar diferentes resultados dependendo da fase da



doença em que são utilizados, ou seja, fase aguda ou crônica (FREITAS, 1961; PINTO, A. Y. D. N. *et al.*, 2008; FERREIRA FILHO *et al.*, 2011)

Alguns métodos utilizados para diagnosticar a doença de Chagas são: aglutinação, fixação de complemento, precipitação, imunofluorescência, hemaglutinação e ELISA, dos quais os mais utilizados são reação de hemaglutinação indireta (HAI), imunofluorescência indireta (IFI) e ELISA (DE MARCHI *et al.*, 2007; DIAZ-BELLO *et al.*, 2008; CARVALHO *et al.*, 2011; CARNEVALI *et al.*, 2017; AZEVEDO *et al.*, 2018; PEREZ-AYALA *et al.*, 2018; SGUASSERO *et al.*, 2018; TAPIA-GARAY *et al.*, 2018).


Na fase aguda da doença, ocorre a presença de imunoglobulinas específicas anti-*T. Cruzi* da classe de Imunoglobulinas M (IgM) contra *T. Cruzi*, que podem ser detectadas e associadas a doença de Chagas, porque estudos mostram que na fase crônica sua presença é tida como normal (FREITAS *et al.*, 1976; FERREIRA FILHO *et al.*, 2011), como já foi dito as técnicas diretas de detecção de parasitas são de escolha.

O diagnóstico da fase crônica requer procedimentos sorológicos para detectar anticorpos imunoglobulinas G (IgG) contra *T. Cruzi*, devido à baixa parasitemia e elevados títulos de imunoglobulinas específicas. Nesta fase, as análises sorológicas mais indicadas são IFI, ELISA, HAI e fixação do complemento (não usados mais pelos laboratórios da rede pública de saúde). Também podem ser úteis métodos de exames parasitológicos indiretos, como xenodiagnóstico (não utilizado na rotina laboratorial) e hemocultura (ALMEIDA e SANTILIANO, 2012; CAMPOS *et al.*, 2017).

É importante destacar os critérios diagnósticos da OMS, pelo menos dois testes sorológicos usados diferentes antígenos do parasito devem ser positivos para situar um diagnóstico de infecção por *T. cruzi*. Porém, ANVISA na **Resolução da Diretoria Colegiada nº 57** determina a obrigatoriedade de apenas uma única técnica de alta sensibilidade para a detecção de anticorpo anti-*T. cruzi* na triagem de doadores de sangue (SANITÁRIA., 2010).

Pesquisas mostram que os sujeitos analisados por dois testes sorológicos com resultados diferentes requerem mais testes. Em alguns casos, após a terceira análise, mesmo o estado da infecção é de difícil confirmação, pois não há técnica padrão-ouro para a infecção crônica do *T. cruzi* (SAEZ-ALQUEZAR, A. J. R. D. P. T. J. O. T. P., 1997; ANDRADE e GONTIJO, 2008; CAVALCANTI e DE MIRANDA GOMES, 2008; MATOS *et al.*, 2015b).

Outro problema é que o diagnóstico da doença de Chagas é complexo, principalmente porque a doença tem uma classificação geográfica comum a outras doenças tropicais que proporcionam quadro clínico semelhante, como a leishmaniose visceral,



malária, esquistossomose, febre tifoide e tuberculose (GONTIJO e MELO, 2004; MATOS *et al.*, 2015b; a; MAÇANEIRO, 2018).

Os métodos sorológicos utilizados para o diagnóstico de doença de Chagas. Vários métodos têm sido utilizados na prática, tais como fixação de complemento, hemaglutinação indireta e IFI. Entretanto, a reação cruzada é frequentemente observada com leishmaniose visceral e leishmaniose tegumentar americana (DA SILVA *et al.*; GONTIJO e MELO, 2004; MATOS *et al.*, 2015b; a).


3.2.8.3. Hemaglutinação Indireta ou Passiva

3.2.8.3.1 Histórico da Hemaglutinação Indireta ou Passiva

Landsteiner em 1903 foi o primeiro a descrever ao fato de que as hemaglutininas frias podem ser absorvidas a partir de um soro e subsequentemente obtido de solução salina. A reação da hemaglutinação a frio é completamente reversível, aumentando a temperatura de 37°C a 40°C. Eritrócitos aglutinados frios libertados do soro por centrifugação, decantação e lavagem com solução de cloreto de sódio (STATS, 1945). Testes diagnósticos por hemaglutinação são relatados desde 1934, sendo que em 1953 foi relatado que a influência do inibidor não específico no teste de inibição da hemaglutinação foi um passo importante para o diagnóstico da influenza (HILLEMANN e WERNER, 1953).

Os mecanismos de componentes biológicos adsorvidos em eritrócitos passaram a ser importantes para o diagnóstico de doenças, e descobriu-se que através de hemaglutinação, os soros podem ser titulados para anticorpos contra antígenos adsorvidos nas células. Além disso, pequenas quantidades dos antígenos podem ser detectadas através de seu poder de inibir a hemaglutinação das células tratadas (BOYDEN, 1951).

Vários são os estudos para padronização de metodologia e antígenos (GOMES *et al.*, 2014) utilizados na reação de hemaglutinação. Têm sido utilizados antígenos extraídos por tratamento de epimastigotas por vibração ultrassônica, por água destilada, por congelamento e descongelamento, por desoxicolato de sódios, por hidróxido de sódio (NaOH) e por TRITON X 100. A HAI tem apresentado comportamento variado, traduzido pelas diferenças na sensibilidade, especificidade, reprodutibilidade da reação. Sendo que de todos os extratos estudados o que melhor apresentou resposta foi extrato



com NaOH para eritrócitos sensibilizados com antígenos de *T. Cruzi* (GOULET *et al.*, 2017; LEE *et al.*, 2017; VILLA *et al.*, 2018).

Um outro avanço na resposta da reação de hemaglutinação para *T.Cruzi*, foi identificar que amostras padrões sorológicas muito diluídas não são importantes nos resultados. Os soros "não úteis" parecem constituir algo na ordem de 17% de todos os soros coletados e testados, assim ficou claro que quanto menos diluída as amostras, melhores são os reagentes feitos para o diagnóstico da doença de Chagas (LUZ, J. G. G. *et al.*, 2015; TEIXEIRA-CARVALHO *et al.*, 2015; FERREIRA, E. C. *et al.*, 2018).

Em 1996 foi padronizado um teste de hemaglutinação rápido, a partir de um reagente de vida curta preparado com células sanguíneas frescas. O reagente e as condições do teste foram consideravelmente modificados e, mais importante, é proposto um reagente de antígeno epimastigota *T. Cruzi* solubilizado em meio alcalino, aplicado em 71 amostras de soro de pacientes com doença de Chagas e de 235 doadores de sangue clinicamente saudáveis. A sensibilidade, a especificidade e os valores preditivos positivo e negativo, foram compatíveis imunofluorescências, reação de hemaglutinação indireta e fixação de complemento (NAGASSESUGAHARA *et al.*, 1996).

Em bancos de sangue e em investigações epidemiológicas foi desenvolvido um teste de hemaglutinação rápido que emprega hemácias de carneiro sensibilizadas com extrato de *T. cruzi*, em suspensão concentrada. A elaboração é feita sobre uma lâmina de vidro, duas gotas de soro ou plasma e uma de reagente, em seguida, agitado em movimentos rotativos e a leitura é feita após 3 minutos (REY, 2001).

Testes de comparação da reação de hemaglutinação com outras técnicas (SUN *et al.*, 2016; GHORBANI *et al.*, 2018), mostram que a reação de hemaglutinação apresenta resultados melhores, do que, por exemplo, o teste de ELISA. Resultados foram obtidos por três laboratórios diferentes, a mesma pesquisa mostrou que existe uma estreita relação da reação de hemaglutinação com imunofluorescência (ROSS e NOVOAMONTERO, 1993; ERGUNAY *et al.*, 2011; PEREYRA *et al.*, 2011; KIM *et al.*, 2014).

3.2.8.3.2. Testes com Reagentes Comercias de Hemaglutinação Indireta

No Brasil programas de qualidade externa em sorologia de bancos de sangue, apontou que reação de hemaglutinação indireta apresenta a maior porcentagem de resultados falsos negativos. Isso levou por iniciativa da Coordenação do Sistema Nacional de Laboratórios de Saúde Pública (COLAB), da Fundação Nacional da Saúde, o Ministério da Saúde instituiu um comitê composto por diferentes membros da comunidade científica e de serviços, com a finalidade de avaliar os conjuntos diagnósticos (CDs): (1) BIOCHAGAS, (2) BIOLAB, (3) CECON, (4) EBRAM, (5) FIOCRUZ, (6) HEMAGEM, (7) IMUNOSERUM, (8) SALCK, (9) TRILAB, (10) WANA, (11) WIENER. (SAEZ-ALQUEZAR, A., 1997)

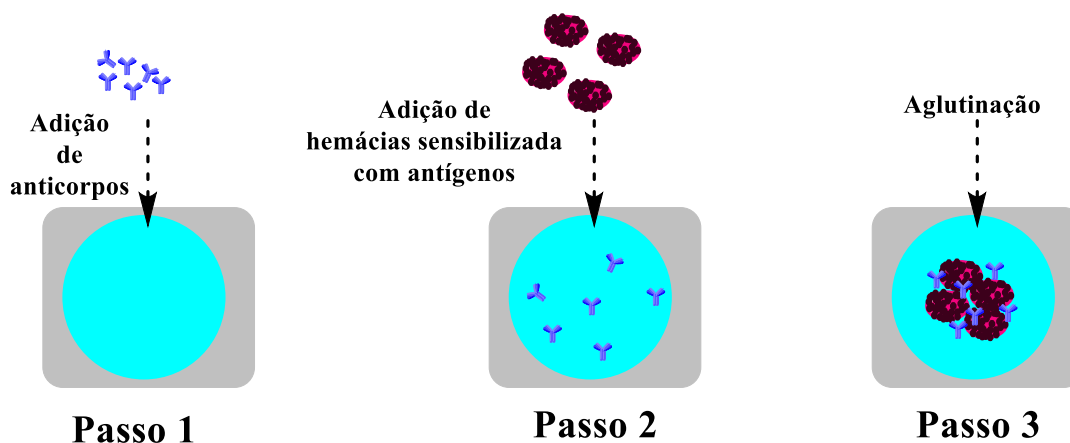
Cinco laboratórios avaliaram os 11 CDs: para o teste da HAI, disponíveis no mercado. O resultado apontou que o desempenho de cada CD para cada soro, por cada um dos 5 laboratórios participantes, foi analisado em relação à reprodutibilidade, especificidade e à sensibilidade de cada um. Destacam-se três pontos importantes neste estudo multicêntrico: 1) a avaliação destes diferentes CDs permitiu detectar diferenças significativas entre os mesmos, sendo que o desempenho foi aceitável (ausência de resultados falso-negativos) apenas para quatro dos CDs avaliados (36%); 2) o desempenho esteve geralmente relacionado ao ponto de corte recomendado pelo fabricante, logo, aqueles que atribuíram pontos de corte baixos (8-16 ou 10-20) tiveram melhor desempenho do que os que fixaram este ponto de corte em 1-40, sem detrimento da especificidade; 3) a inclusão de todos os elementos necessários para o processamento dos testes otimiza o desempenho do respectivo CD. Realizaram-se recomendações para os fabricantes, visando melhorar a técnica de cada CD, bem como avaliações periódicas do desempenho (SAEZ-ALQUEZAR, A., 1997).

Vários estudos sorológicos da doença de Chagas incluem nos seus métodos a reação de hemaglutinação indireta (MORET *et al.*, 2003; PICKA *et al.*, 2007; FERRER *et al.*, 2013; MENDES, R. S. *et al.*, 2013; NEGRETTE *et al.*, 2013; GARCIA *et al.*, 2014; GONZALEZ *et al.*, 2017; SGUASSERO *et al.*, 2018).

3.2.8.3.3. Princípio da Reação Hemaglutinação Indireta

O teste HAI, tem por princípio a aglutinação de hemácias sensibilizadas com antígeno *T. cruzi*, em presença de soro contendo anticorpos contra esse parasita (REICHE *et al.*, 1996). O teste tem como suporte uma placa com 96 cavidades ou em fila de 8 ou 12 cavidades, além disso é necessário um pano úmido para neutralizar as forças eletrostáticas. O teste é constituído de três etapas: (1) adiciona-se a amostra, que sendo reagente, contém anticorpos anti-*T. cruzi*, (2) hemácias sensibilizadas com antígenos de *T. cruzi* são adicionados, (3) a reação antígeno-anticorpo é visualizada pela aglutinação das hemácias (LUQUETTI *et al.*, 1998). Veja na Figura 2.

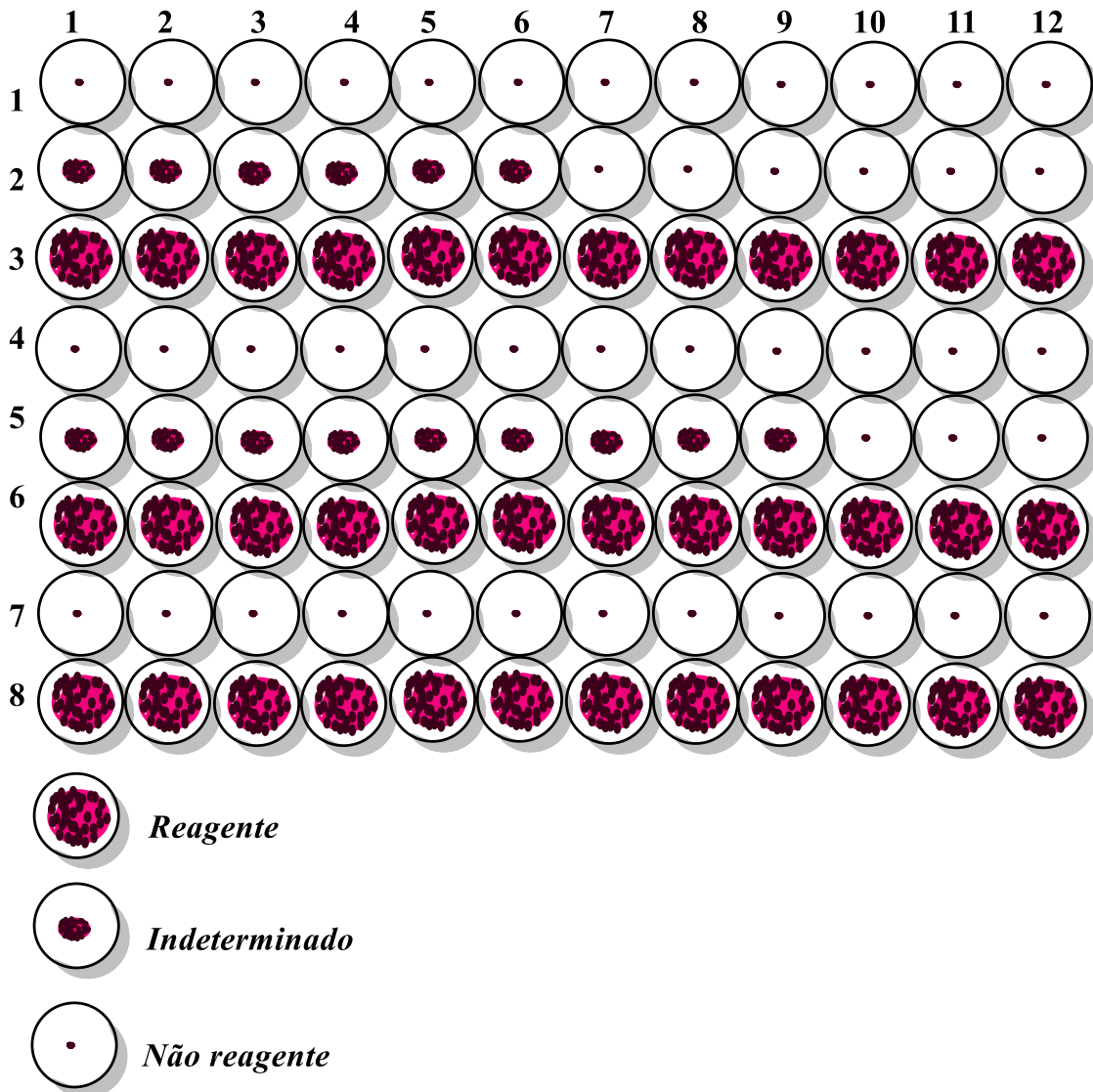
Figura 2. Desenho esquemático de HAI.



Fonte: adaptada de Luquetti, 1998.

A resposta observada na placa é simples. Ao olho nu, com a placa de microtitulação indo contra a luz ou com espelho. É possível observar três estruturas distintas: (1) amostras reagente quando as hemácias sensibilizadas, forma uma espécie de manto ou tape, de forma homogênea, ocupando uma área maior do que 50% do fundo da placa, as vezes com bordas irregulares (2) amostra indeterminada quando apresenta padrão distinto do reagente e do não reagente, (3) amostra não reagente as hemácias são observadas com um pequeno botão no fundo poço da placa, ou seja, as hemácias acumulam bem próximas (LUQUETTI *et al.*, 1998). Veja na Figura 3.

Figura 3. Desenho esquemático da visualização na placa de microtitulação de amostra reagente, de amostra indeterminada e de amostra não reagente de HAI.

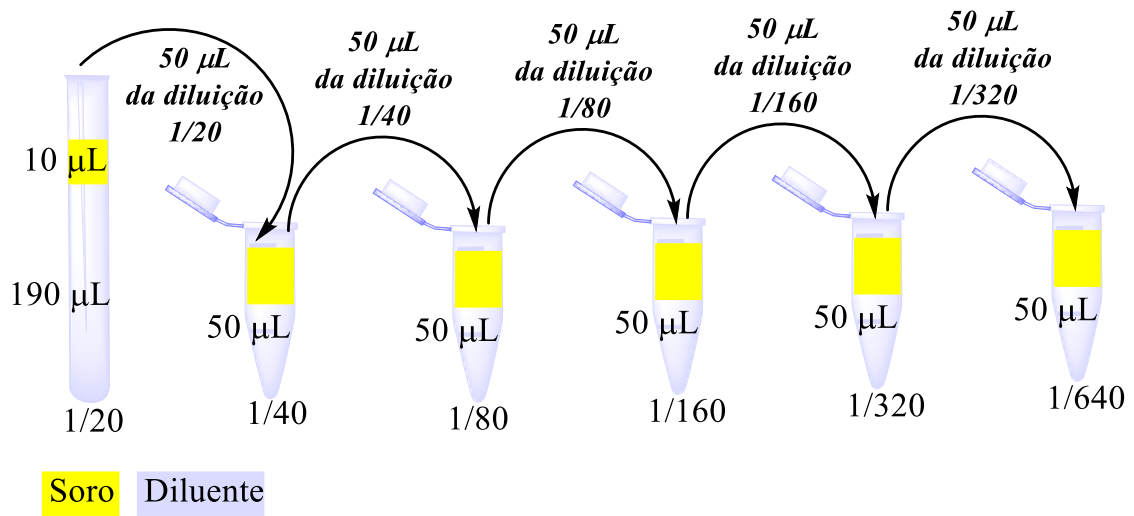


Fonte: adaptada de Luquetti, 1998.

3.2.8.3.4. Teste de Reação de Hemaglutinação Indireta Semiquantitativo

Os soros que mostram reação positiva ou indeterminado no teste qualitativo devem ser titulados, porque será possível determinar qual a diluição ideal para amostra e assim obter um resultado semiquantitativo da amostra analisada. A execução do teste deve ser feita de acordo com o fabricante. No geral, o fabricante fornece diluente específico e define a diluição inicial da amostra para o teste qualitativo. As diluições da amostra para teste semiquantitativo são preparadas, em muitos casos, na razão 2 a partir da diluição do teste qualitativo (LUQUETTI *et al.*, 1998). Veja na Figura 4.

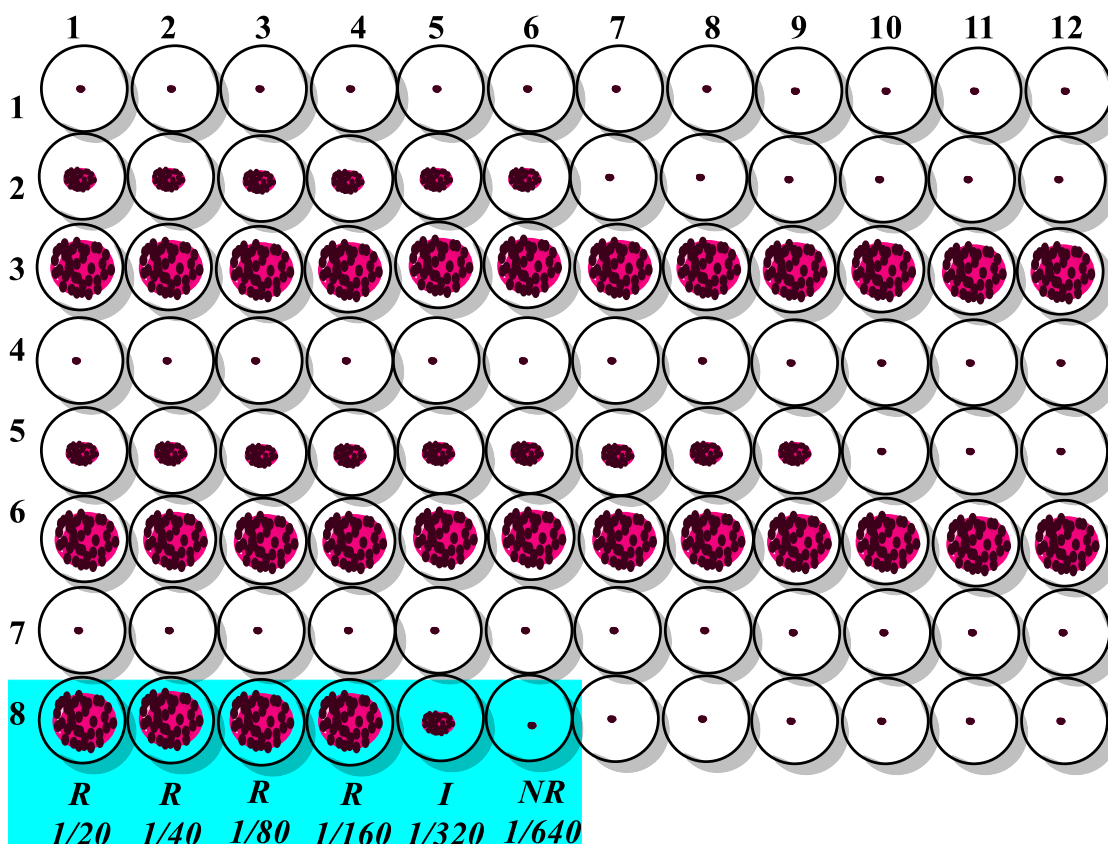
Figura 4. Desenho esquemático de diluição seriada da amostra para o teste de HAI



Fonte: adaptada de Luquetti, 1998.

O título da amostra é determinado da seguinte maneira: cada uma das diluições da amostra em um poço da placa de microtitulação. O título obedece à diluição em que a amostra ainda foi reagente, desde que a diluição seguinte tenha um resultado negativo ou indeterminado, veja, na Figura 5, o resultado obtido com cada uma das diluições da amostra, o título foi de 160, porque a diluição 1/160 foi a última onde a amostra ainda foi reagente.

Figura 5. Desenho esquemático das reações de cada uma das diluições da amostra no HAI. R – Amostra reagente, I – Amostra indeterminada e NR – Amostra não reagente.



Fonte: adaptada de Luquetti, 1998.

Assim, a uma metodologia é muito simples que tem sensibilidade > 90%, empregada para o diagnóstico de fase aguda ou crônica (COSTA *et al.*, 2013).

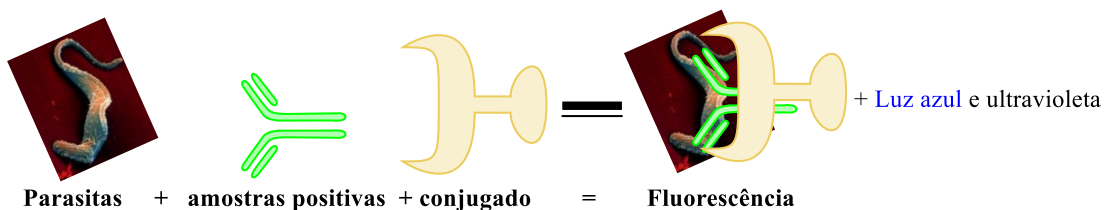
3.2.8.3.5. Imunofluorescência Indireta

A técnica de IFI foi padronizada em 1959, e em 1966 padronizou-se a reação de IFI em lâminas. O procedimento consiste em lâminas de microscopia para fluorescência em que parasitas são fixados (*T. cruzi*), os quais reagem com soros ou plasmas humanos (CAMARGO, 1966).

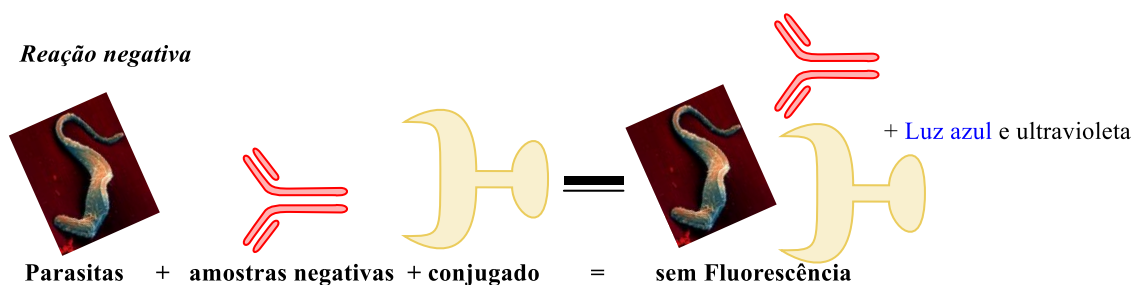
A reação entre o antígeno fixado e o anticorpo presente nas amostras é visualizada após a adição de anti-imunoglobulina humana (Ig), conjugada com isotiocianato de fluoresceína. Para a leitura da reação deve-se utilizar microscópio para fluorescência (ZAUZA, 2000), veja na Figura 6 esquema da resposta do teste IFI.

Figura 6. Esquema da resposta do teste IFI

Reação positiva



Reação negativa



Caracteriza-se por ser um método com grande sensibilidade na fase aguda. Por detectar IgM anti-*T. cruzi*, desde que, o conjugado seja específico, anti-IgM. No entanto, é preferível a utilização de IgG que não oferecem riscos de reações cruzadas e reações falsos positivos (REY, 2001).

3.2.8.4. Ensaio Imunoenzimático para o Diagnóstico da Infecção por *T. cruzi*.

O *kit* de diagnóstico ensaio imunoenzimático para o diagnóstico da infecção por *t. cruzi* ((EI)-Recombinante-Chagas-Biomanguinhos®) produzido por Bio-Manguinhos. Os antígenos produzidos no início pelo grupo de pesquisa do Dr. Samuel Goldenberg do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do IOC/FIOCRUZ. Este *kit* possui patente no Brasil (BR PT 1100553-0), nos Estados Unidos (US 5736348) e na Europa (919203356.2). O qual possui características semelhantes ao método de ELISA direta (GADELHA, 2003). Estudos que utilizaram o *kit* apontam para excelente performance apresentando 100% de especificidade e sensibilidade (GOMES *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2002).

3.2.8.4.1. Princípio do Teste EI-Recombinante-Chagas-Biomanguinhos®

Antígenos solúveis e purificados de *T. Cruzi* foram obtidos a partir de cultura “in vitro”, que foram previamente adsorvidos nas cavidades de microplacas/strips (fase sólida). A seguir, adicionam-se, devidamente diluídos, os controles do teste e as amostras a serem analisadas, que possuindo anticorpos específicos, vão se fixar aos antígenos (MACCRINDLE *et al.*, 1985).

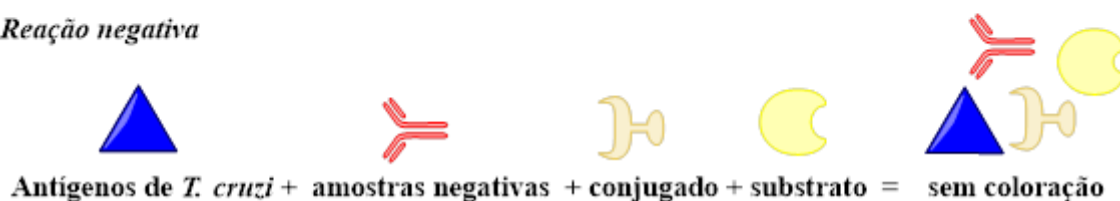
Para evidenciação da reação, utiliza-se uma substância cromógena (tetrametilbenzidina-TMB), que pela ação da peroxidase com o peróxido de hidrogênio, forma um composto de coloração azul turquesa. Adicionando o ácido sulfúrico que interrompe a reação, passa a apresentar uma coloração amarela, em caso positivo (reagente). Nas cavidades em que não houver anticorpos específicos, não haverá desenvolvimento de cor, o que caracteriza uma reação negativa (não reagente). Os resultados podem ser avaliados por meio de um espectrofotômetro para microplaca em comprimento de onda de 450 nm (MACCRINDLE *et al.*, 1985). Veja na Figura 7 o esquema da resposta do teste EI-Recombinante-Chagas-Biomanguinhos®

Figura 7. Esquema da resposta do teste EI-Recombinante-Chagas-Biomanguinhos®

Reação positiva



Reação negativa

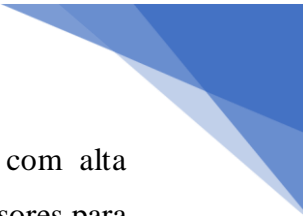


3.1.4.2.4. Pesquisa em Biossensores para o Diagnóstico da Doença de Chagas

Sensores químicos transformam a informação química em sinal analítico. O sensor químico é caracterizado de maneira simples, como um receptor molecular em série com um transdutor físico-químico, em que, a informação química pode estar associada à concentração do componente específico na amostra (ATIF *et al.*, 2019; CHEN, Q. L. *et al.*, 2019; ZHANG, C. M. *et al.*, 2019). O biossensor é obtido quando envolve um receptor molecular de natureza bioquímica (LIENEMANN *et al.*, 2018; LUAN *et al.*, 2018; SINGHA *et al.*, 2018). A seletividade e a sensibilidade de um biossensor, tem como correspondência o componente biológico e as características do detector eletroquímico, respectivamente. O detector eletroquímico (transdutor) deve ser atenciosamente escolhido e preparado. Em sua escolha, deve-se levar em conta a natureza do mecanismo do biossensor como conhecida. O mecanismo é dependente fundamentalmente do tipo de componentes ativos envolvidos e do modo de transdução de sinal (JANIAK *et al.*, 2018). Por exemplo, biossensores enzimáticos, a comunicação eletroquímica entre sítio redox e o eletrodo deve ser garantida, através da preservação do sítio ativo da enzima após imobilização do substrato (GOMES, F. O. *et al.*, 2019; MANDAL *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2019).

Para doença de Chagas não há vacina. Portanto, o controle de vetores e os testes diagnósticos são métodos eficazes de prevenção da doença. O exame de sangue é necessário para prevenir a infecção por transfusão de sangue e transplante de órgão (DAMHORST *et al.*, 2015).

A detecção de antígeno nos soros sanguíneos é útil apenas para a fase aguda da doença de Chagas, mas anticorpos nesta fase a detecção é precária (REGIART *et al.*, 2016; BALOUZ, AGUERO, *et al.*, 2017; EGUEZ *et al.*, 2017). A Detecção de anticorpos anti-T. *Cruzi* na investigação sorológica é o método de escolha para o diagnóstico etiológico da doença de Chagas na fase crônica, considerando a especificidade e sensibilidade dos testes utilizados na rotina de análises clínicas, mas ainda são caros e pouco confiável, em muitas vezes é necessário a aplicação de várias técnicas na comprovação (UMEZAWA *et al.*, 1996; PAREDES *et al.*, 2009; FLORES-CHAVEZ *et al.*, 2010; SANTOS, F. L. N. *et al.*, 2016).



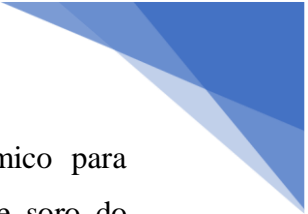
Os procedimentos de diagnóstico clínico devem ser sensíveis e com alta reprodutibilidade e repetibilidade. Diferentes esforços de pesquisa em biossensores para o diagnóstico da doença de Chagas têm sido desenvolvido (DAMHORST *et al.*, 2015; CAMPUZANO *et al.*, 2017; FERNANDES *et al.*, 2017; JANISSEN *et al.*, 2017; ROCHA-GASO *et al.*, 2017).

Vale destacar que dois tipos de biossensores que foram investigados para o diagnóstico de doença de Chagas podem ser classificados em eletroquímico e óptico. Entre os biossensores eletroquímicos, biossensores amperométricos (FERREIRA *et al.*, 2005; SALINAS *et al.*, 2005; RIBONE *et al.*, 2006; BELLUZO *et al.*, 2011; PEREIRA *et al.*, 2011; CAMPUZANO *et al.*, 2017) e impedimétricos (DINIZ *et al.*, 2003; SANTOS, C. S. *et al.*, 2016) podem ser achados. Enquanto que os biossensores ópticos com transdutores de ressonância de plasma de superfície (SPR) (LIU *et al.*, 2019; SUN *et al.*, 2019; XU *et al.*, 2019; YANG *et al.*, 2019; ZHANG, H. *et al.*, 2019) são relatado (LUZ, J. G. G. *et al.*, 2015).

Ferrei *et al.* (2005), utilizou-se de um potenciostato-galvanostato para realizar as medidas, eles relatam um biossensor para o diagnóstico da doença de Chagas, que consistia de um imunossensor amperométrico que requer uma interação eletroquímica. Salinas *et al.* (2005), também relatou um imunossensor amperométrico com tempo de análise de no máximo 23 minutos, o qual apresentou maior sensibilidade em comparação com o método ELISA.

Ribone *et al.* (2006), desenvolveu um dispositivo que consistiu em um eletrodo de ouro modificado com um tiol sensibilizado com proteínas do parasita. O método foi baseado na medida da corrente catalítica após a adição do substrato enzimático, que ocorre quando um soro positivo é usado para construir o biossensor. A eficiência de discriminação entre soros positivos e negativos foi de 100% para as amostras estudadas.

Belluso *et al.* (2011) projetaram biossensores (imunoensaios indiretos) com detecção amperométrica utilizando receptores quiméricos feitos sob medida para reagir com o analito, imunoglobulina G específica anti-*Trypanosoma cruzi* (IgG). Os biossensores projetados de quiméricas mostraram 100% de especificidade com amostras que revelaram resultados falso-positivos ao usar outros biorreceptores. O limite de detecção foi de 62 ng mL⁻¹, que é oito vezes menor do que o obtido com o *kit* de ensaio ELISA. A reutilização do biossensor foi avaliada. O sinal foi de aproximadamente 80% do original após a realização de 10 determinações consecutivas.



Pereira et al. (2011) desenvolveram um imunossensor eletroquímico para detectar IgG específica para anticorpos *T. Cruzi* presentes nas amostras de soro do paciente com um limite de detecção de $3,07 \text{ ng mL}^{-1}$. Eles alcançaram este resultado funcionalizando o sensor com proteínas do *T. Cruzi* de membranas epimastigotas como antígenos e pela eletrodeposição de nanopartículas de ouro onde os antígenos do *T. Cruzi* foram imobilizados. Os autores afirmaram um ligeiro efeito eletrocatalítico devido ao uso de nanopartículas de ouro que aumentaram a sensibilidade do eletrodo e a eficiência de imobilização do antígeno do *T. Cruzi*.

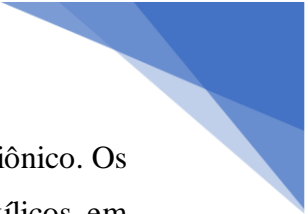
Em 2016 foi apresentada uma plataforma eletroquímica portátil para sorodiagnóstico de doenças infecciosas baseadas em microesferas magnéticas. A portabilidade desta plataforma foi alcançada empregando um potenciostato miniportátil. Eles demonstraram com sucesso o uso desta plataforma para o diagnóstico da doença de Chagas com ensaios de tempos de leitura de 20 s, nos quais obtiveram resultados semelhantes aos de ELISA em termos de sensibilidade e seletividade. No entanto, este sistema ainda não está disponível comercialmente. Além disso, a técnica requer a detecção de reações eletroquímicas para conduzir os ensaios, o que leva a etapas indiretas. Outras técnicas de detecção, como o uso de sensores acústicos, poderiam evitar essas etapas no futuro (CORTINA *et al.*, 2016).

Regiart et al (2016) utilizaram eletrodo de carbono, o qual foi modificado com nanopartículas de ouro e funcionalizado com antígeno recombinante de fase aguda. O limite de detecção alcançado foi de $3,03 \text{ ng mL}^{-1}$ (REGIART *et al.*, 2016).

Janissen et al (2017) desenvolveram um biossensor de nanofios baseado no transistor de efeito de campo que atingiu níveis de detecção ultrasensível a 6 fM para um marcador de proteína da Doença de Chagas (JANISSEN *et al.*, 2017).

Diniz et al (2003) utilizaram uma cadeia polipeptídica formada por antígenos recombinantes, antígeno repetitivo citoplasmático e antígeno repetitivo flagelar de *Trypanosoma cruzi*, foram adsorvidos em eletrodos de ouro e platina. Verificaram que a adsorção é fortemente sensível à camada de óxido na superfície do eletrodo. Na maioria dos experimentos, os antígenos mantiveram sua atividade como observado através da interação com soros de pacientes chagásicos crônicos. Os resultados foram expressos em termos da resistência de transferência de carga através da interface.

Santos et al (2016) descreveram o desenvolvimento de um imunossensor eletroquímico para a detecção qualitativa da tripanossomíase americana em amostras de soro. O imunossensor foi construído utilizando a técnica de monocamada automontada



com substrato de ouro modificado com monocamada de ácido 3-mercaptopropiônico. Os antígenos de *T. Cruzi* foram imobilizados após ativação de grupos carboxílicos em monocamada de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida e N-hidroxissuccinimida. Os parâmetros que podem interferir na resposta impedimétrica da resposta imunossensora, como concentração, tempo de incubação na solução de antígenos de *T. Cruzi*, concentração de albumina sérica bovina e tempo de incubação na solução de anticorpos anti-*T. Cruzi* foram otimizados. O imunossensor mostrou-se seletivo e sensível na detecção qualitativa de anticorpos contra o *T. cruzi* em amostras de soro infectadas por anticorpos do tipo toxoplasma.

Luz et al. (2015) apresentaram o primeiro biossensor para o diagnóstico de doença de Chagas baseado em ressonância plasmônica de superfície. Eles obtiveram o parâmetro relacionado à presença de anticorpos anti-*T. Cruzi* em soro humano em aproximadamente 20 minutos. O grupo realizou uma comparação do imunoensaio com ELISA, o qual apresentou uma sensibilidade satisfatória de 100%, ao comparar a outros métodos, como PCR, que tem uma sensibilidade de 90% e uma especificidade satisfatória de 97,2% (LUZ, J. G. *et al.*, 2015). Assim, fica claro que o uso é adequado para diagnóstico da doença de Chagas. No entanto, o uso da ressonância plasmônica de superfície, ainda consome altos volumes de reagentes e o equipamento só pode ser usado em laboratório. Além disso mesmo que os biossensores ópticos possam ser altamente sensíveis, o custo do equipamento ressonância plasmônica de superfície é superior a R\$ 194.000,00. Por esta razão, muitos pesquisadores, não pode pagar por tais sistema (COLTRO *et al.*, 2014).

Na Tabela 2 são fornecidas algumas vantagens e desvantagens de técnicas para o diagnóstico da doença de Chagas.

Tabela 2. Vantagens e desvantagens de técnicas para o diagnóstico da doença de Chagas.

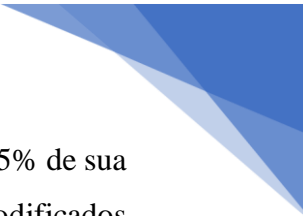
* LD: limite de detecção.

Métodos	Desvantagens	Vantagens	LD	Referências
Biossensores	Custo elevado; Não comercializado.	Área de superfície ativa aumentada; Alta condutividade Características eletrocatalíticas melhoradas Alta sensibilidade e seletividade	3 ng mL ⁻¹	(REGIART <i>et al.</i> , 2016)
PCR	Instrumentação complexa Custo elevado Técnico especializado Tempos de ensaio longo	Alta sensibilidade e seletividade Melhora a precisão de métodos	1 parasite mL ⁻¹	(RAMIREZ <i>et al.</i> , 2018)
Teste rápido de fluxo lateral (cromatografia em papel)	Alta possibilidade de falso negativo Volume alto de reagente Especificidade 96,8%	Rápido (10-15 min) Baixo custo Alta sensibilidade	~20 nM	(BARFIELD <i>et al.</i> , 2011) (SANCHEZ-CAMARGO <i>et al.</i> , 2014)
ELISA	Tempos de ensaio longo Instrumentação complexa Custo elevado Apresenta reação cruzada com outros agentes infecciosos, por exemplo Leishmaniose	Alta sensibilidade e seletividade Bom funcionamento sem interferentes, como fluidos corporais como saliva	~30 nM	(DIGUTA <i>et al.</i> , 2010) (THACKER <i>et al.</i> , 1996; IQBAL <i>et al.</i> , 2000; PERUSKI e PERUSKI, 2003)

3.3. Eletrodo Lápis de Grafite

É crescente o uso de eletrodos a base de carbono devido viabilidade na determinação de substâncias que sustentam a reação de oxidação, das mais variadas áreas, das quais podem ser destacadas a indústria farmacêutica, indústria de alimentos, meio ambiente etc. Um destaque dos eletrodos de carbono é eletrodo lápis de grafite devido suas propriedades como alta reatividade eletroquímica, rigidez elevada, baixa toxicidade, preço baixo, descartabilidade, isso tem viabilizado sua utilização em análises farmacêuticas, poluentes ambientais e etc (BOSCH *et al.*, 2006).

Outro ponto importante sobre o eletrodo lápis de grafite são os diversos procedimentos para alterar sua superfície que são chamados de procedimentos pré-tratamento específicos, tais procedimentos são químicos, tratamento com plasma por radiofrequência, oxidação de fase gasosa e eletroquímica, e até polimento mecânico, estes procedimentos buscam melhorar a qualidade da superfície com mudança de grupo funcionais (KAHLERT, 2008). Assim, permite o eletrodo lápis de grafite facilmente ser utilizado como um eletrodo modificado(OZCAN e SAHIN, 2011). É notório que



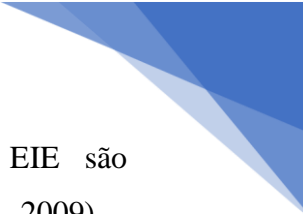
eletrodos a lápis de grafite exibem excelente estabilidade, conservando mais de 75% de sua atividade ótima durante o período de medidas, os eletrodos de grafite foram modificados por polianilina e tinham as seguintes dimensões 60 mm de comprimento e 1,4 mm de diâmetro (KASHYAP *et al.*, 2015).

Hasanjani e Zarei (2018) (HASANJANI e ZAREI, 2018) desenvolveram um sensor eletroquímico tendo como base eletrodo lápis de grafite com as seguintes características tipo HB, dureza média, 0,5 mm de diâmetro, o qual foi modificado com nanopartículas de platina e óxido de grafeno reduzido para determinação de ceftazidima, com limite de detecção foi determinado como $2,2 \times 10^{-13}$ M. Odewunmi *et al.* (2019) desenvolveram um eletrodo lápis de grafite modificado com óxido de prata para a determinação de DL-metionina em soro humano, o qual mostrou um limite de detecção em 0,42 μ M (ODEWUNMI *et al.*, 2019). Wang e Kawde (2001) (WANG e KAWDE, 2001) descreveram características e vantagens de um biossensor de hibridização de DNA renovável baseado em um transdutor de eletrodo lápis de grafite com comprimento de 6 mm, a superfície deste biossensor foi renovada rapidamente, por uma simples extrusão mecânica, evitando assim a necessidade de um passo adicional de regeneração. O sensor, assim, responde rapidamente à "troca" entre soluções oligonucleotídicas alvo e não complementares, com o uso de superfícies novas que apagam os efeitos da memória.

Não foi apresentado na literatura, detecção de anticorpos que caracterizam a doença de Chagas e utilizam eletrodo de grafite.

3.4. Métodos Eletroanalíticos em Imunoensaios

Técnicas eletroquímicas têm sido utilizadas para caracterizar e avaliar imunoensaios: crono(amperometria) (GAO *et al.*, 2016; TSAI *et al.*, 2016; SHAO *et al.*, 2017; TSAI *et al.*, 2017; LEE *et al.*, 2018), cronopotenciometria (TULLY *et al.*, 2008; CAO *et al.*, 2015; JIA *et al.*, 2015; YU *et al.*, 2016; LAKEY *et al.*, 2019), varredura de potencial linear (VPL) (HAJI-HASHEMI *et al.*, 2018; TUFA *et al.*, 2018; BONAKDAR *et al.*, 2019; NAJAFI *et al.*, 2019; THIRUMALRAJ *et al.*, 2019), voltametria cíclica (VC) (técnicas DC) (HU *et al.*, 2019; THIRUMALRAJ *et al.*, 2019; TRUTA e SALES, 2019; YADAV *et al.*, 2019; YILMAZ *et al.*, 2019) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) (BERTOK *et al.*, 2019; CHEN, L. H. *et al.*, 2019; MORAES *et al.*, 2019; TRUTA e SALES, 2019; YAMAN *et al.*, 2019; YILMAZ *et al.*, 2019). Para



caracterização eletroquímica de procedimentos com eletrodos, VC e EIE são possivelmente os métodos eletroquímicos mais empregados (FERREIRA *et al.*, 2009).

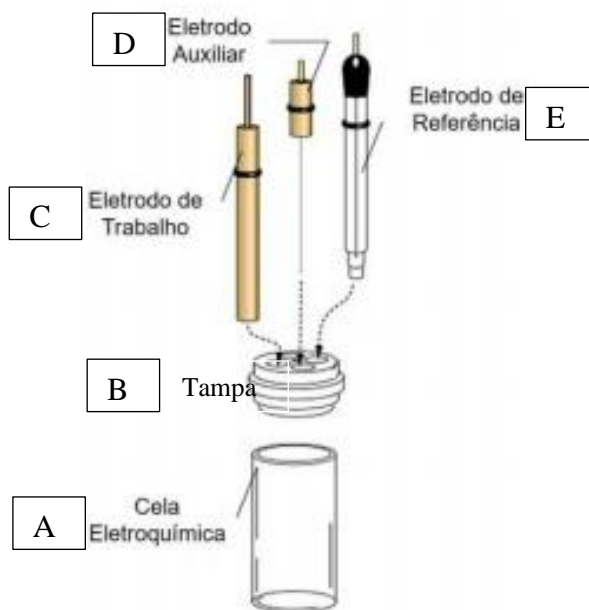
3.4.1. Voltametria Cíclica (VC)

Em análises qualitativas e quantitativas a voltametria cíclica (VC) é uma técnica usada quando tem envolvimento de analíto adsorvido num eletrodo ou de um analíto em solução. Pois oferece uma explicação dos potenciais redox de espécies eletroativas além de informações importantes sobre efeito do material do eletrodo de trabalho e do meio (eletrólito de suporte e/ou pH) empregados sobre o processo redox (WESTBROEK *et al.*, 2005).

VC é a técnica eletroquímica mais frequentemente empregada para obter as iniciais informações sobre a natureza da superfície do eletrodo, como a sua pureza (CISZEWSKI *et al.*, 2019; HUANG e ZHANG, 2019; TAMAYO *et al.*, 2019), estabilidade (GHINNIRE *et al.*, 2019; YILMAZ *et al.*, 2019; YIN *et al.*, 2019), reprodutibilidade e repetibilidade (GHOLIVAND *et al.*, 2019; TARAHOMI *et al.*, 2019; YILMAZ *et al.*, 2019).

Normalmente, os procedimentos voltamétricos são empregados em uma cela eletroquímica usando um eletrodo de trabalho (formado pelo substrato condutor em exame), um contra eletrodo (comumente de platina) e um eletrodo de referência (que pode ser um eletrodo de calomelano saturado (ECS), prata/cloreto de prata (Ag/AgCl) ou o eletrodo padrão de hidrogênio imersos em uma solução condutora (eletrólito) (PACHECO *et al.*, 2013) como ilustrados na Figura 8.

Figura 8. Representação de uma (A) cela eletroquímica com (B) tampa para acoplamento do (C) o eletrodo de trabalho, (D) o eletrodo auxiliar ou contra eletrodo e (E) o eletrodo de referência.



Fonte: adaptada de Morillo 2017.

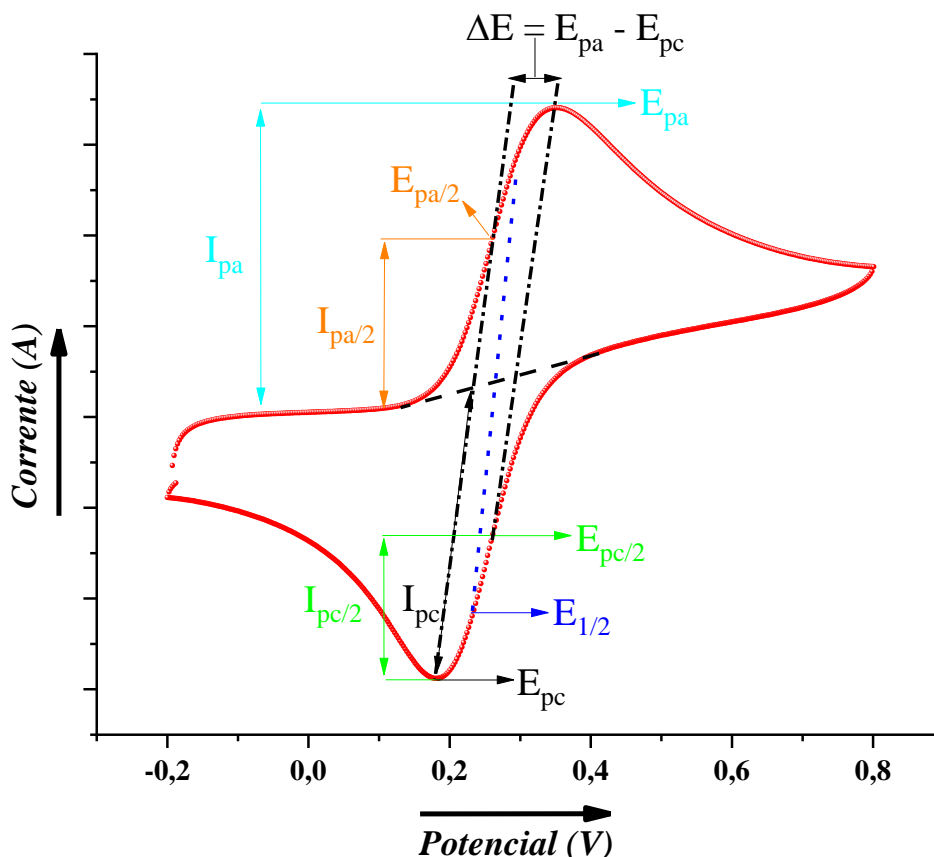
Na voltametria cíclica, transporte de massa de espécies eletroativas para oxidação ou redução ocorrem apenas por difusão. Assim, a fim de evitar correntes de migração e garantir a condutividade, um eletrólito suporte é adicionada à solução, geralmente os sais de metal alcalino e especialmente de tetra-álquil-amônio provaram ser os mais eficazes. (HEINZE, 1984).

Além da corrente Faradaic baseada na transferência de carga heterogênea no limite de fase, há também uma corrente capacitiva do carregamento da dupla camada elétrica sem transferência de carga entre o eletrodo e o eletrólito. Isto é medido com equipamento adequado e registrado como uma curva de voltagem-corrente característica - um voltamograma cíclico (HEINZE, 1984).

Uso de potenciostatos em conjunto com um arranjo de células de três eletrodos. Neste sistema a corrente flui através do eletrodo de trabalho e do contra eletrodo, enquanto quase nenhuma corrente flui através do eletrodo de referência devido à sua alta impedância. A fim de manter a queda do potencial ôhmico existente o mais pequena possível, o eletrodo de referência é colocado o mais próximo possível do eletrodo de trabalho usando um capilar de Luggin's.

Os parâmetros mais formidáveis que podem ser alcançados a partir de um voltamograma cíclico estão exibidos na Figura 9, e são: corrente de pico anódico (I_{pa}) ou pico de oxidação, corrente de meio pico anódico ($I_{pa/2}$), corrente de pico catódico (I_{pc}) ou pico de redução, corrente de meio pico catódico ($I_{pc/2}$), potencial de pico anódico (E_{pa}), potencial de meio pico anódico ($E_{pa/2}$), potencial de pico catódico (E_{pc}), potencial de meio pico catódico ($E_{pc/2}$), potencial de meia onda ($E_{1/2}$), e diferença entre o potencial de pico anódico e de pico catódico (ΔE_p).

Figura 9. Voltamograma cíclico para transferência de carga reversível.



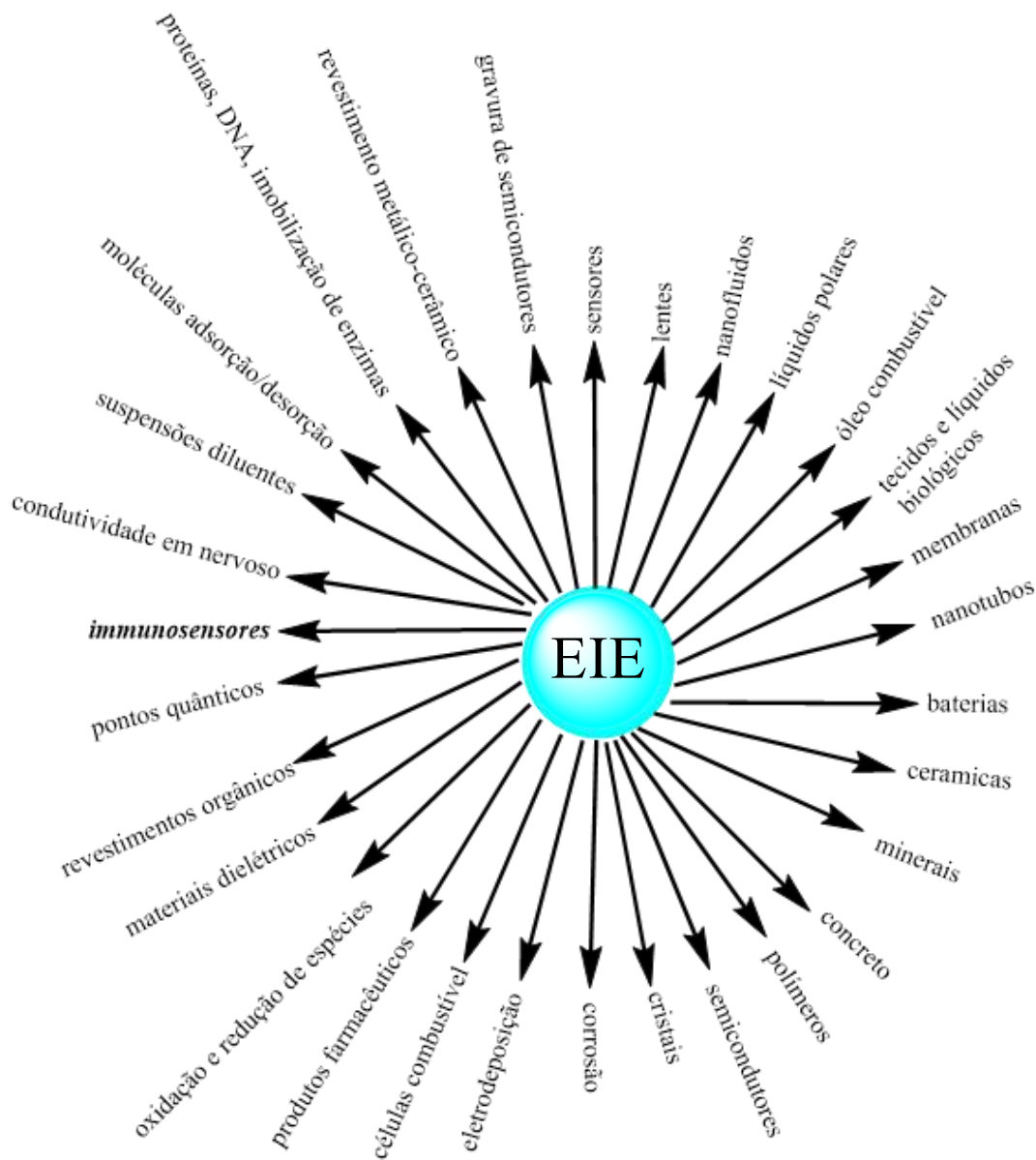
Às vezes CV é usado para limpar a superfície do eletrodo; para ativação; e para reconstruir a superfície do eletrodo, ou para determinar a área de superfície ativa do eletrodo. Esta técnica também pode indicar alguma contaminação do eletrólito usado como no caso de uma solução tampão de fosfato.

3.4.2. Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE)

A espectroscopia de impedância eletroquímica é uma técnica muito útil para analisar quase todos os fenômenos que acontecem em processos de eletrodos e interfaces, devido a sua elevada sensibilidade em identificar alterações em processos interfaciais, estruturais e reacionais, uma vez que ela pode explorar uma ampla faixa de frequência que cobre um vasto intervalo de valores constantes no tempo (DURRANI *et al.*, 2014; LARIBI *et al.*, 2018; BUFFON e STRADIOTTO, 2019).

A EIE consente separar diferentes procedimentos como capacitivo (ALMEIDA *et al.*, 2019; HAJRA *et al.*, 2019; KIM *et al.*, 2019), transferência de carga (HUANG *et al.*, 2019; JIANG *et al.*, 2019; ZIADI *et al.*, 2019), transferência de massa (ASL e MANTHIRAM, 2019; HUANG *et al.*, 2019; ZHAO *et al.*, 2019), adsorção/dessorção (LIN *et al.*, 2019; WU *et al.*, 2019; ZHANG e WANG, 2019) e outros processos (DUDEK *et al.*, 2019; NIKOLIC *et al.*, 2019; TRABELSI *et al.*, 2019). Por esta razão, EIE é uma ferramenta poderosa para investigar os mecanismos de reações eletroquímicas, medindo propriedades de transporte de materiais, medindo propriedades dielétricas de materiais, explorando propriedades de eletrodos porosos, investigando superfícies passivas, investigando eletrodos modificados, e mais, pode utilizar um par redox na solução eletrolítica (HOLLAND-CUNZ *et al.*, 2018; UMESHBABU *et al.*, 2018; SOPCIC *et al.*, 2019) ou não usar um par redox na solução de trabalho, para alcançar a estabilidade, as propriedades elétricas e físico-químicas da superfície modificada (LI, D. *et al.*, 2016; PELJO *et al.*, 2016; GUIN *et al.*, 2017), mas dificilmente são realizados no campo dos imunossensores (KATZ e WILLNER, 2003; YAN *et al.*, 2012; DERKUS *et al.*, 2013). As possibilidades de uso do EIE são mostradas na Figura 10.

Figura 10. Alguns sistemas que podem ser analisados empregando a EIE.



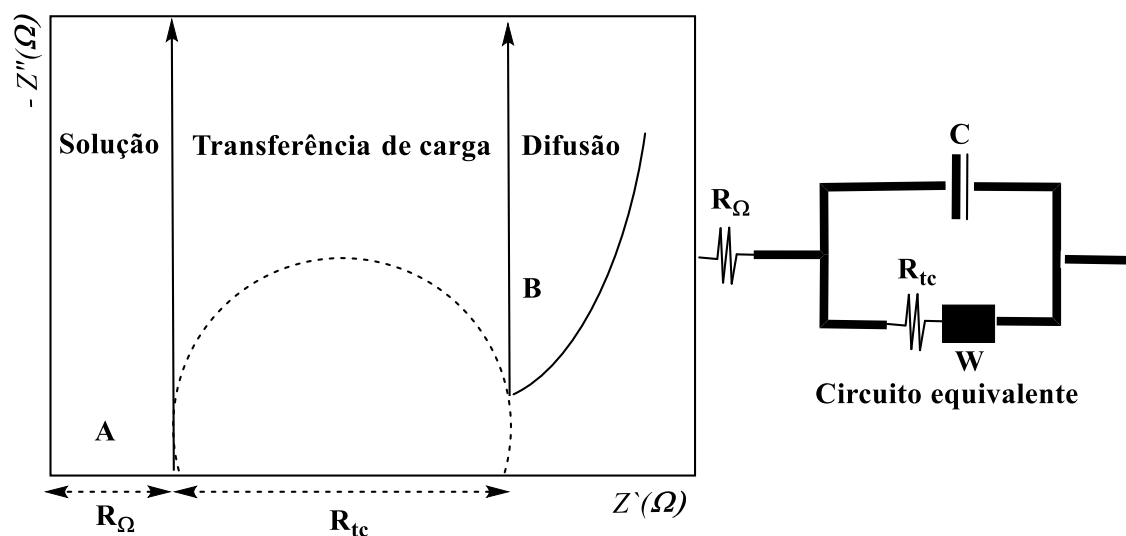
Fonte: adaptado de Ferreira et al 2011

Uma importante vantagem do uso do EIE é que devido à baixa amplitude da onda senoidal (corrente ou potencial) aplicada para alterar o sistema em relação ao seu equilíbrio ou estado estacionário, apesar das amplitudes dos sinais de entrada e saída possam ser desiguais e possam oferecer um deslocamento de fase (GINER-SANZ *et al.*, 2018; MOHAJERI *et al.*, 2018; SHIN *et al.*, 2018; ZHANG e CHEN, 2019). Se a perturbação for adequada, a resposta pode ser avaliada empregando a teoria de circuitos elétricos, que pode ser simulada por um arranjo apropriado de resistores, capacitores e

indutores, admitindo um sistema linear. Esses circuitos elétricos equivalentes são padrões desenvolvidos para ilustrar os dados de impedância eletroquímica e devem corresponder a pelo menos duas condições: todos os dados dos circuitos elétricos equivalentes devem ter um sentido físico claro e conexos a uma propriedade do sistema que deve ser adequado de produzir resposta elétrica; os circuitos elétricos equivalentes devem ser tão simples quanto imaginável e gerar espectros de impedância que sejam diferentes do experimental apenas por uma baixa quantidade definida. O erro necessita ser baixo, não periódico ou regular como uma função da frequência (CHANG *et al.*, 2017).

A EIE estuda a resposta da impedância (Z) de um sistema por meio do emprego de uma tensão alternada (AC) com pequena amplitude e em diferentes frequências (REN *et al.*, 2018; SULEKAR *et al.*, 2019; WAGHMARE *et al.*, 2019). Geralmente as medidas são representadas em termos de impedância real (Z') e impedância imaginária ($-Z''$) em um gráfico denominado diagrama de Nyquist, ilustrado na Figura 11. A interpretação desse diagrama comumente é feita pela correlação com um circuito elétrico equivalente, como o circuito de Randles, que representa os processos químicos que acontecem no sistema de forma mais simples (CHEN, X. Q. *et al.*, 2019; PIZARRO-CARMONA *et al.*, 2019). Com isso é possível alcançar vários dados do sistema, como a dupla camada elétrica, a condutividade de filmes, processos de transporte e difusão de cargas, entre outros (ZHOU *et al.*, 2009).


Figura 11. Ilustração do Diagrama Nyquist e o circuito elétrico equivalente de Randles.



A - Região de alta frequência (MHz - kHz)

B - Região de baixa frequência (Hz - mHz)

Fonte: adaptada Huang et al 2004.



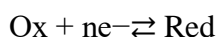
O diagrama de Nyquist revela regiões: altas frequências estão associadas com a resistência da solução eletrolítica; frequências intermediárias (diâmetro do semicírculo) representam a resistência a transferência de carga na interface eletrodo-eletrólito; e a baixas frequências está relacionada por processos de transporte de massa por difusão (POLO *et al.*, 2002; DOI *et al.*, 2005; YAN *et al.*, 2016; HWANG *et al.*, 2018). O circuito de Randles é composto pela resistência ôhmica da solução eletrolítica (R_{Ω}), impedância de Warburg resultante da difusão de íons de eletrólito para a interface do eletrodo (W), a resistência a transferência de carga da sonda redox (R_{tc}) e a capacitância da dupla camada elétrica (C) (HUANG *et al.*, 2004; ROTO e VILLEMURE, 2006; HASTAK *et al.*, 2012; ALAVI *et al.*, 2015; MOYA, 2018).

O circuito de Randles descreve suficientemente as regiões de altas frequências, contudo, em regiões de baixas frequências, mais complexas, o semicírculo deslocado (com o centro que sai do eixo x) indica um desempenho não ideal do capacitor puro (C), sendo necessário trocar por um elemento de fase constante (do inglês Constant Phase Element – CPE) para modelar o desempenho do capacitor imperfeito associado a dupla camada elétrica. Esse comportamento não ideal da dupla camada elétrica pode estar relacionado a fatores como adsorção lenta de íons e heterogeneidades químicas da superfície (HARK *et al.*, 2009; LOSIEWICZ *et al.*, 2011; LI, M. G. *et al.*, 2016).

3.4.3. Cronopotenciometria

Aparelhos potenciométricos proporcionam o acúmulo de um potencial de carga no eletrodo de trabalho em comparação com o eletrodo de referência em uma célula eletroquímica quando nenhuma corrente expressiva flui entre eles ou zero (CUI *et al.*, 2018; FERREIRA, M. R. *et al.*, 2018; SIGOLAEVA *et al.*, 2018). Em outras palavras, a potenciométrie fornece dados sobre a atividade iônica em uma reação eletroquímica. Para medidas potenciométricas, a afinidade entre a concentração e o potencial é governada pela equação de Nernst, onde potencial da cela (E_c) representa observado na corrente zero (GHALAMI-CHOOBAR *et al.*, 2017; GUZMAN *et al.*, 2017; DOU *et al.*, 2018). Isso também é chamado de força eletromotriz.

No caso (a), assumindo o seguinte equilíbrio eletroquímico em um eletrodo



(Ox - formas oxidadas e Red – formas reduzidas), a respectiva equação de Nernst

Equação 3.3.3.1. é a seguinte:

$$E_c = E_c^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{a_{\text{Ox}}}{a_{\text{Red}}} \quad (3.3.3.1.)$$

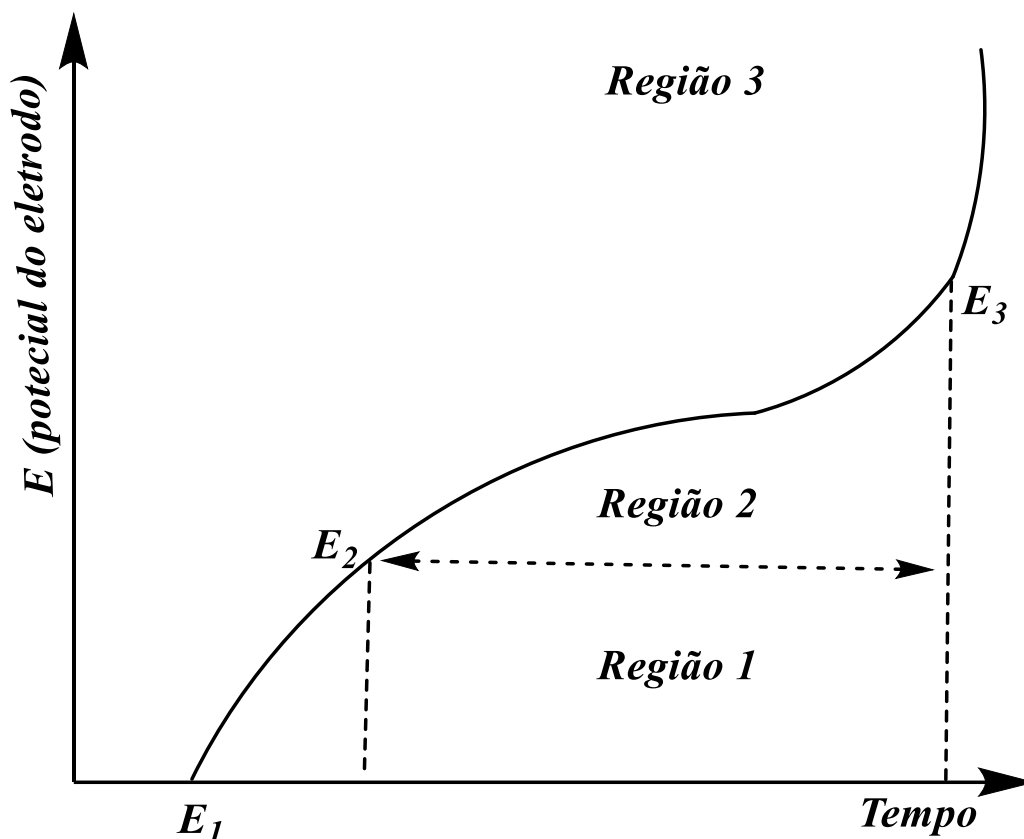
onde E_c é o potencial de equilíbrio, E_c^0 é o potencial padrão do eletrodo versus um eletrodo padrão, R é a constante do gás, T é a temperatura absoluta, n é o número de elétrons transferidos na reação do eletrodo, F é a constante de Faraday e a é a atividade de equilíbrio das formas oxidada e reduzida (SCHOLZ, 2017).

A determinação direta da concentração do íon analito com a equação de Nernst é mencionada como potenciometria direta (MAKARYCHEV-MIKHAILOV *et al.*, 2006; JASIELEC *et al.*, 2010; LUBERT e KALCHER, 2010).

A cronopotenciometria é um dos escassos métodos eletroquímicos susceptíveis de fornecer, com bastante concisão, resultados quantitativos acerca de reações globais de eletrodo complexas. O método incide no registro, em função do tempo, do potencial do eletrodo em curso, (denominado usualmente eletrodo indicador ou de trabalho), em relação a um eletrodo de referência, quando da sua polarização por imposição de uma corrente, aplicada entre o eletrodo de trabalho e um eletrodo auxiliar, também designado por contra eletrodo (MARTINS e SEQUEIRA, 1988).

A curva cronopotenciométrica potencial-tempo que se obtém através desta técnica, consiste nas seguintes regiões principais: Região 1 - Esta região corresponde ao estado do eletrodo nos momentos iniciais da sua polarização. O potencial assumido pelo eletrodo na ausência de polarização, ou seja o potencial de abandono, E_1 , dá lugar a um potencial E_2 , ao qual precipita a reação eletroquímica, e essa variação de potencial deve-se essencialmente à carga da dupla camada elétrica; Região 2 - Nesta região, a variação de potencial de E_2 para E_3 está relacionada com a reação de eletrodo propriamente dita. E_3 é o potencial ao qual se anula a concentração da espécie eletroativa junto ao eletrodo. Região 3 - Nesta região, a velocidade de descarga da espécie eletroativa não pode, por si só, corresponder à densidade de corrente imposta. Por consequência, a variação de potencial que se segue a E_3 provém da descarga de uma outra espécie dissolvida, ou da decomposição eletrolítica do solvente ou eletrólito suporte (MARTINS e SEQUEIRA, 1988).

Figura 12. Curva cronopotenciométrica típica



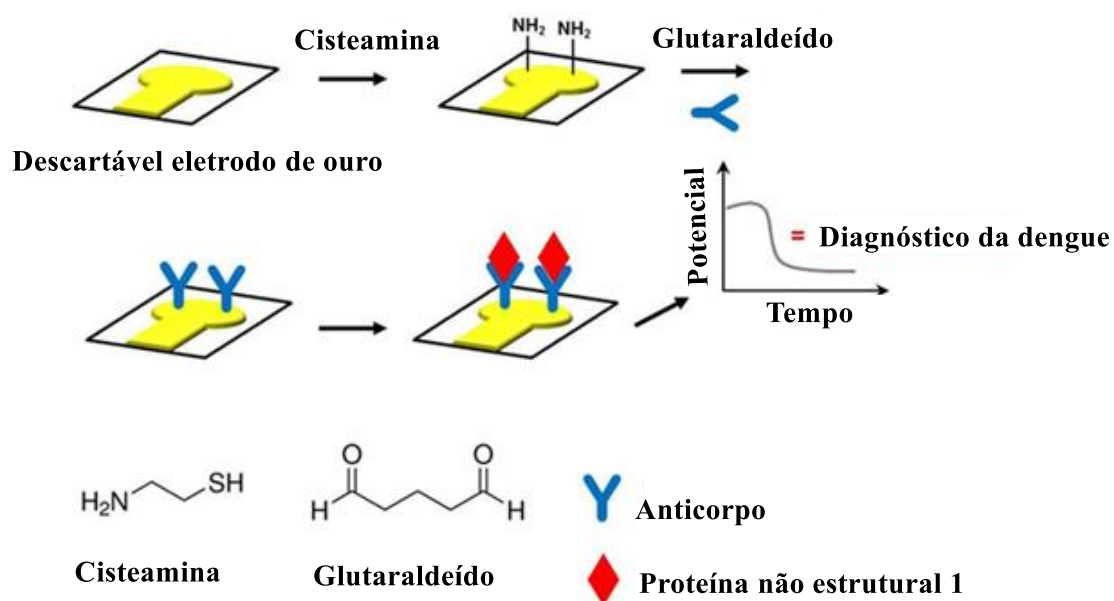
A cronopotenciometria tem sido uma técnica usada para confirmação de bioafinidade. Como por exemplo, na bioafinidade *in situ* em superfícies entre enzimas e seus cofatores moleculares ou macromoleculares. A álcool desidrogenase e a lactato desidrogenase ligam-se a um eletrodo de monocamada funcionalizado por dinucleotídeo de nicotinamida e adenina oxidado com constantes de associação correspondentes a $1,6 \times 10^4$ e $1,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, respectivamente. A citocromo oxidase liga-se a uma monocamada de citocromo c orientada, montada sobre um eletrodo de ouro, com uma constante de associação de $K_a = 1,2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ (KHARITONOV *et al.*, 2000).

Em resposta lipossomas marcados com biotina e a enzima peroxidase que são usados como sonda para amplificar detecção de interações antígeno-anticorpo ou ligação oligonucleotídeo-DNA, pode ser seguida por cronopotenciometria (ALFONTA *et al.*, 2001).

A cronopotenciometria também foi técnica utilizada para medir em corrente constante a variação de potencial em função do tempo, utilizando um eletrodo de ouro

descartável modificado para detectar a proteína não estrutural 1, que é secretada pelo vírus da dengue nos primeiros dias de infecção, através de anticorpos anti proteína não estrutural 1 imobilizados. Veja na Figura 13 a representação esquemática da preparação do imunossensor (FIGUEIREDO *et al.*, 2015).

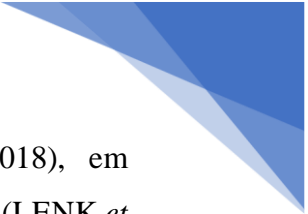
Figura 13. Representação esquemática da preparação imunossensor para diagnóstico da dengue.



3.4. Prospecção Tecnológica: Potencialidades de Diagnóstico para Doenças de Chagas com Foco em Bioeletroquímica Relacionado a Reação de Hemaglutinação.

Milhares de pessoas em todo o mundo tem a sua saúde ameaçada por doenças negligenciadas, as doenças negligenciadas são formadas por um grupo de 17 doenças infecciosas, que são incapacitantes, endêmicas em 149 países, que são causadas por uma variedade de patógenos, como bactérias, vírus, helmintos e protozoários. Das quais, podemos destacar a doença de Chagas (MONTESINO *et al.*, 2015).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) destaca para 2020 metas para doença de Chagas que são (1) interromper transmissão intradomiciliar e (2) ter todas as pessoas infectadas sob cuidados em países endêmicos (CUCUNUBA *et al.*, 2018). A utilização de inseticidas tem se mostrado eficaz no primeiro objetivo, mas a transmissão ainda é




ativa e recorrente em muitos países desenvolvidos (GRAY *et al.*, 2018), em desenvolvimento (WALECKX *et al.*, 2018) e principalmente em países pobres (LENK *et al.*, 2018). Para o segundo objetivo, ainda se tem muito a se desenvolver, pois só abrange os recentemente infectados, sendo ainda responsável por óbitos e por perda da capacidade de trabalho nos países de alto e de baixo índice de infectados (FERRAZ *et al.*, 2018).

Apesar da descoberta, pelo médico brasileiro Carlos Chagas, do agente casual da doença de Chagas já ter mais de 100 anos, e todos os avanços tecnológicos apresentados no mundo, ainda continua sendo um desafio (BENZIGER *et al.*, 2015), a indústria farmacêutica tem contribuído de forma diminuta para obter um diagnóstico preciso e uma cura da doença de Chagas, por não ter viabilidade financeira (LEPESHEVA, 2013).

Devido ao negligenciamento da doença de Chagas, muitas pessoas são afetadas em todo mundo, o desenvolvimento de um tratamento mais eficaz e seguro continua sendo um desafio a ser superado pelas novas gerações, a fase crônica da doença é bem assistida no diagnóstico da doença, mas as taxas de curas são baixas, as principais drogas administradas é nifurtimox e Benznidazol, as drogas de escolha para o tratamento de pacientes chagásicos, e tem uma indicação significativa de cura devido à sorologia negativa ou testes parasitológicos, quando o tratamento é realizado nas fases latente e aguda da infecção, além da potencialidade para prevenir alterações eletrocardiográficas típicas da doença de Chagas, mas as duas substâncias que podem ser empregadas no tratamento, são altamente tóxicas (DE SOUZA *et al.*, 2012; SANTOS *et al.*, 2012; CALDAS *et al.*, 2019).

Os tratamentos derivados de plantas não têm sido uma perspectiva promissora. Características como modelos de doenças, tratamentos, segurança toxicológica e viés metodológico foram analisados. A evidência pré-clínica disponível está em alto risco de viés. A ausência ou caracterização incompleta de modelos animais, protocolos de tratamento e análises fitoquímicas/de toxicidade prejudicaram a validade interna dos estudos individuais. Resultados contraditórios de uma mesma espécie de planta comprometem a validade externa da evidência, dificultando a determinação da eficácia, segurança e potencial biotecnológico de produtos derivados de plantas no desenvolvimento de novos agentes anti-infecciosos para o tratamento de infecções por *T. cruzi* (CALDAS *et al.*, 2019).

Apesar da redução acentuada do número de casos por transmissão vetorial da doença de Chagas, outros mecanismos de transmissão são alarmantes, tais como:



transfusões de sangue, acidentes de laboratório, transplantes de órgãos, fezes de insetos na alimentação e da mãe para o filho durante a gestação. A infecção congênita poderia perpetuar a doença de Chagas indefinidamente, mesmo em países sem transmissão vetorial. Estima-se que 30% das pessoas infectadas desenvolvam complicações cardíacas ou digestivas ao longo da vida, potencialmente fatais (STILLWAGGON *et al.*, 2018).

Vale salientar que no Brasil, mesmo com programas de controle da doença de Chagas, diminuíram a prevalência da doença de Chagas na América. Juntamente com a migração para áreas urbanas e aumento da expectativa de vida, um novo cenário para a doença de Chagas surgiu no Brasil com a maioria dos pacientes atualmente idosos vivendo em áreas urbanas. No entanto, Chagas aguda, os casos de doença ainda ocorrem devido à transmissão vetorial por vetores silvestres e à transmissão oral por alimentos contaminados, principalmente na região amazônica, ocorre pela ingestão de alimentos contaminados e é comumente mostrada em mamíferos silvestres, pois eles podem se alimentar de triatomíneos e outros mamíferos infectados. A infecção por *T. Cruzi* em alimentos na natureza é acidental e pode ocorrer durante a colheita, armazenamento, transporte ou preparação. Em humanos, esse evento ocorre acidentalmente após a ingestão de suco de cana contaminado, polpa de açaí, sopas, comida caseira, leite e carne semicruda. Vários casos de doença de Chagas na fase aguda foram relatados como surtos, caracterizados por grupos de indivíduos reunidos no mesmo local, que ingeriram a mesma adoeceu quase simultaneamente, com febre e manifestações de uma infecção sistêmica. Apesar do crescente número de casos agudos, relatos dessa forma de doença são raros na literatura (DE MATTOS *et al.*, 2017; FERREIRA, R. T. B. *et al.*, 2018; VIZZONI *et al.*, 2018).

Entre os casos de doenças de Chagas confirmados no Brasil no período de 2000 a 2013, observou-se que a forma de transmissão oral foi a mais frequente em todos os anos. No entanto, vale ressaltar que mais de 20% dos casos foram encerrados com a forma de transmissão ignorada ou sem preenchimento deste campo na ficha de notificação, sendo que 87,5% destes registros são do estado do Pará (Tabela 3) (MS, 2015).

Tabela 3. Casos confirmados de doença de Chagas aguda, segundo ano de notificação e forma de transmissão. Brasil, 2000 a 2013.

Forma de transmissão	Ano de notificação														Total	%
	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013		
Oral	31	18	64	47	51	27	106	92	68	169	68	117	127	96	1081	68,9
Ignorada*	10	6	11	8	9	3	8	59	24	34	36	61	49	54	372	23,7
Vetorial				1	1		4	4	11	16	25	10	8	20	100	6,4
Outras**									1	1	1	1	3	4	11	0,7
Vertical											1	1	1	2	6	0,4
Total	41	24	75	56	61	30	118	156	104	220	131	190	188	176	1.570	100

*Foram incluídos os casos com a variável "forma provável de transmissão" em branco.

**Transmissão acidental e transfusional.

Fonte: Sinan e CGDT/DEVIT/SVS/MS. Atualizado em maio/2014. Dados sujeitos à alteração.

A casuística de doença de Chagas passou a ser evidenciada de fato a partir do primeiro surto oficialmente investigado de Chagas aguda por transmissão oral ocorrido em Santa Catarina em 2005, com provável relação à ingestão de caldo de cana contaminado com *T. Cruzi*. A partir desse momento, percebeu-se que a forma oral teria importante papel na cadeia de transmissão da doença, com repercussão positiva na sensibilidade da vigilância. Casos isolados, bem como surtos de doença de Chagas por transmissão oral, passaram a ser detectados com maior frequência na região Norte do país, contribuindo para o aumento de casos ao longo dos anos. Concomitantemente, surgiu a necessidade de estruturação da Vigilância Epidemiológica de Chagas nessa região e interface com a Vigilância Sanitária, com vistas a melhorias nas ações de prevenção e controle, além da definição de fluxos de referência para o diagnóstico, tratamento e acompanhamento de complicações da doença (MS, 2015).

Apesar da ocorrência em menor proporção da transmissão vetorial (6,4%), observa-se a persistência desta forma a partir de 2006, ano da certificação de interrupção de transmissão por *T. infestans* no País. E, em relação à transmissão vertical, 50% dos registros ocorreram no estado do Rio Grande do Sul. A região Norte contribuiu com a maior proporção de casos do País (91,1%), tendo sido registrados no estado do Pará cerca de 75% de todos os casos ocorridos no Brasil (Tabela 4), e mais de 50% apresentaram início de sintomas entre os meses de agosto e novembro para os anos de 2007 a 2013, período que coincide com os meses de safra do açaí no Pará. Vale ressaltar que as Unidades da Federação não descritas na Tabela 4 não tiveram registros de casos confirmados de doença de Chagas no Sinan no período avaliado (MS, 2015).

Tabela 4. Casos confirmados de doença de Chagas aguda, segundo Região, Unidade da Federação de residência e forma de transmissão. Brasil, 2000 a 2013

Região/Unidade da Federação	Forma de transmissão					Total	%
	Oral	Vetorial	Vertical	Ignorada*	Outras**		
Norte	1023	70	1	329	7	1430	91,1
Rondônia	0	2	0	0	0	2	0,1
Acre	5	2	0	0	0	7	0,4
Amazonas	56	14	0	7	1	78	5,0
Roraima	0	0	0	1	0	1	0,1
Pará	812	49	1	306	5	1.173	74,7
Amapá	131	1	0	13	1	146	9,3
Tocantins	19	2	0	2	0	23	1,5
Nordeste	33	14	1	23	2	73	4,6
Maranhão	11	7	0	5	1	24	1,5
Piauí	0	3	0	1	0	4	0,3
Ceará	8	1	0	0	0	9	0,6
Rio Grande do Norte	1	0	1	0	0	2	0,1
Paraíba	0	0	0	1	0	1	0,1
Pernambuco	0	2	0	15	0	17	1,1
Sergipe	0	1	0	1	0	2	0,1
Bahia	13	0	0	0	1	14	0,9
Sudeste	0	2	1	8	1	12	0,8
Minas Gerais	0	0	0	6	0	6	0,4
Espírito Santo	0	0	0	0	1	1	0,1
Rio de Janeiro	0	1	0	0	0	1	0,1
São Paulo	0	1	1	2	0	4	0,3
Sul	25	0	3	0	0	28	1,8
Santa Catarina	24	0	0	0	0	24	1,5
Rio Grande do Sul	1	0	3	0	0	4	0,3
Centro-Oeste	0	14	0	12	1	27	1,7
Mato Grosso	0	4	0	0	0	4	0,3
Goiás	0	10	0	12	1	23	1,5
Brasil	1081	100	6	372	11	1570	100

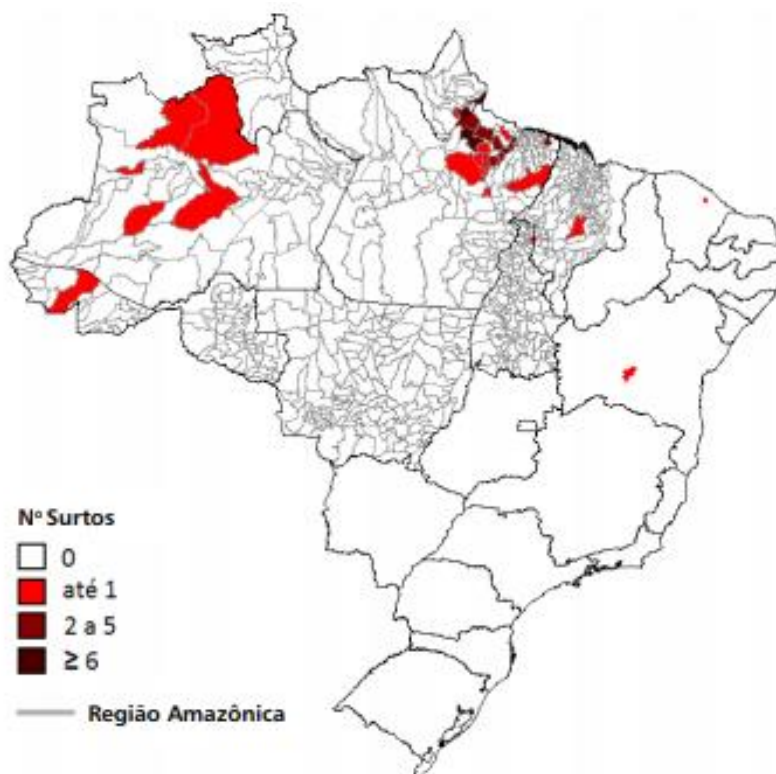
*Foram incluídos os casos sem preenchimento da forma provável de transmissão.

**Transmissão acidental e transfusional.

Fonte: Sinan e CGDT/DEVIT/SVS/MS. Atualizado em maio/2014. Dados sujeitos à alteração.

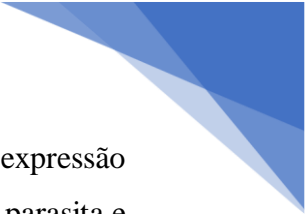
Foram contabilizados 112 surtos no território nacional entre 2005 e 2013, envolvendo em sua totalidade 35 municípios da Região Amazônica (Figura 14). A fonte provável de infecção foi a ingestão de alimentos contaminados com *T. cruzi*, entre eles: açaí, bacaba, jaci (coquinho), suco de caldo de cana e o palmito de babaçu. A maioria dos surtos ocorreu nos estados do Pará 75,9% (85) e Amapá 12,5% (14) e, em menores proporções, nos estados do Amazonas 4,5% (5), Tocantins 1,8% (2) e Bahia 1,8% (2) (MS, 2015).

Figura 14. Distribuição dos surtos de doença de Chagas aguda ocorridos no Brasil, em destaque para Região Amazônica Legal, 2005 a 2013.



Fonte: adaptada de Sinan e CGDT/DEVIT/SVS/MS. Atualizado em 2014. Dados sujeitos à alteração.

Para diagnosticar a doença de Chagas, métodos demorados e tradicionais são utilizados (SCHATTSCHEIDER *et al.*, 1992; GARCIA *et al.*, 1995; CARRASCO *et al.*, 1997; BRYAN *et al.*, 2004; KIRCHHOFF *et al.*, 2006; PARICIO-TALAYERO *et al.*, 2008; MISCHLER *et al.*, 2012; ALVIAREZ *et al.*, 2014; MORDINI *et al.*, 2016; EGUEZ *et al.*, 2017; FREITAS *et al.*, 2017; GONZALEZ *et al.*, 2017; ANTINORI *et al.*, 2018; BARTSCH *et al.*, 2018; CAMPOS *et al.*, 2018; DOS SANTOS *et al.*, 2018; FREITAS *et al.*, 2018; NASCIMENTO *et al.*, 2018; PANE *et al.*, 2018; PEREZ-AYALA *et al.*, 2018; TAPIA-GARAY *et al.*, 2018). A sociedade científica tem buscado novos métodos para diagnosticar a doença de Chagas. (GARZON *et al.*, 2015) identificaram a reativação da doença de Chagas por meio da reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qRT-PCR). (BOCHARD-VILLANUEVA *et al.*, 2015) usaram a ressonância magnética cardíaca com contraste (RMC), a qual permitiu a detecção precoce do envolvimento miocárdico pela infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. (BURLE-CALDAS *et al.*, 2015) destacam estratégias genômicas que estão produzindo uma mudança em



direção a uma perspectiva global em estudos de função gênica, com o exame da expressão e papéis biológicos de redes gênicas em diferentes estágios do ciclo de vida do parasita e sob diferentes contextos do parasita hospedeiro, eles descrevem as ferramentas moleculares e os protocolos disponíveis para realizar a manipulação genética do genoma do *T. Cruzi*, com ênfase nas estratégias de edição genética descritas que facilitarão as análises genômicas funcionais em grande escala. (LUZ *et al.*, 2016) aplicaram um imunoenensaio baseado na ressonância de plasmon de superfície para detectar anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi* em soros humanos.

O diagnóstico da doença de Chagas também vem sendo estudo por métodos eletroquímicos. Dos quais, destacam-se os biossensores amperométricos. Esses biossensores são baseados na reação de afinidade entre antígeno/anticorpo (imunossensor) ou DNA/DNA (genossensor) ou reação catalítica enzimática.

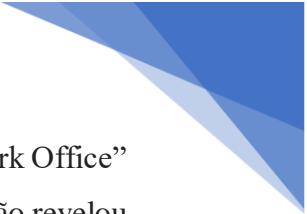
Quando o receptor molecular envolve um componente bioquímico, um biossensor é obtido (MILLER, 1966; WOLLERT, 1966; THOMPSON *et al.*, 1979; AIZAWA *et al.*, 1989; ADANYI *et al.*, 1999; NAYAK *et al.*, 2009). Em um biossensor, o componente biológico é responsável pela seletividade (STEVENS *et al.*, 2018) enquanto as características do detector eletroquímico determinam a sensibilidade (ALI *et al.*, 2018). Isso significa que o detector eletroquímico (transdutor) deve ser cuidadosamente selecionado e preparado (STEPHEN e ABRAHAM, 2019). Em sua seleção, a natureza do mecanismo do biossensor deve ser conhecida (DINCAU *et al.*, 2018; ZOU *et al.*, 2018; KALAIYARASAN e JOSEPH, 2019). Este mecanismo depende basicamente do tipo de componentes ativos envolvidos e o modo de transdução de sinal (APOSTOLOU e KINTZIOS, 2018; DE ALMEIDA *et al.*, 2018; MA *et al.*, 2018).

Biossensores aliados as técnicas eletroquímicas prometem cada vez mais, novas inovações e aperfeiçoamento, com testes rápidos com alta sensibilidade, especificidade e estabilidade para detecção de doenças (BANDARA *et al.*, 2018; SHAN *et al.*, 2018; ZAINUDDIN *et al.*, 2018).

Diante do exposto, buscou-se analisar o grau de desenvolvimento tecnológico através da prospecção tecnológica sobre o diagnóstico da doença de Chagas envolvendo a HAI, através de buscas de artigos e de patentes. Para isso usou-se base “Web of Science”¹ e as bases de dados do Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI)²,

¹ webofscience.com

² www.inpi.gov.br



“European Patent Convention” (EPO)³, “The United States Patent and Trademark Office” (USPTO)⁴, e “World intellectual property organization” (WIPO)⁵. A pesquisa não revelou avanços do diagnóstico para doença de Chagas via reação de hemaglutinação. Um estudo feito sobre as potencialidades de diagnóstico para doenças de chagas encontra-se em anexo (apêndice A)(DA SILVA e DA LUZ JÚNIOR, 2016).


³ www.epo.org

⁴ www.uspto.gov

⁵ www.wipo.int

Referências

- ADANYI, N. et al. Interfacial enzyme partitioning as a tool for constructing biosensors. **Acta Alimentaria**, v. 28, n. 4, p. 329-338, Dec 1999.
- AGRELO, R. S. J. R. D. S. B. D. M. T. 2nd Meeting Intergovernmental Initiative of Chagas' Disease Surveillance and Prevention in the Amazônia. v. 39, n. 3, p. 311-317, 2006.
- AIZAWA, M. et al. Molecular film technology for biosensors. **Thin Solid Films**, v. 180, p. 227-233, Nov 1989.
- ALAVI, S. M. M.; BIRKL, C. R.; HOWEY, D. A. Time-domain fitting of battery electrochemical impedance models. **Journal of Power Sources**, v. 288, p. 345-352, Aug 2015.
- ALFONTA, L.; SINGH, A. K.; WILLNER, I. Liposomes labeled with biotin and horseradish peroxidase: A probe for the enhanced amplification of antigen-antibody or oligonucleotide-DNA sensing processes by the precipitation of an insoluble product on electrodes. **Analytical Chemistry**, v. 73, n. 1, p. 91-102, Jan 2001.
- ALI, H. M.; MAKKI, S. A.; ABD, A. N. Enhanced photo-response of porous silicon photo-detectors by embedding Titanium-dioxide nano-particles. In: MAKKI, S. A.; LATEF, F., *et al* (Ed.). **Ibn Al-Haitham First International Scientific Conference**. Bristol: Iop Publishing Ltd, v.1003, 2018. (Journal of Physics Conference Series).
- ALMEIDA, B.; SANTILIANO, F. J. E. B., CENTRO CIENTÍFICO CONHECER-GOIÂNIA. Levantamento dos métodos de diagnóstico para a doença de Chagas. v. 8, n. 14, p. 1586, 2012.
- ALMEIDA, D. A. L.; COUTO, A. B.; FERREIRA, N. G. Flexible polyaniline/reduced graphene oxide/carbon fiber composites applied as electrodes for supercapacitors. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 788, p. 453-460, Jun 2019.
- ALVIAREZ, Y. et al. Standardization of a direct agglutination test for the immunodiagnosis of Chagas disease. **Biomedica**, v. 34, n. 2, p. 308-317, Apr-Jun 2014.
- AMARAL, F. A. et al. INFLUÊNCIA DA FISIOTERAPIA AQUÁTICA NA FLEXIBILIDADE DE IDOSOS HIPERTENSOS E DIABÉTICOS. v. 56, n. S4, p. 1-11, 2019.
- ANDRADE, A. Q. D.; GONTIJO, E. D. J. R. D. S. B. D. M. T. Neonatal screening for congenital Chagas infection: application of latent class analysis for diagnostic test evaluation. v. 41, n. 6, p. 615-620, 2008.
- ANDRADE, J. et al. I Latin American Guideline for the Diagnosis and Treatment of Chagas' Heart Disease. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 97, n. 2, p. 01-48, 2011.
- ANTINORI, S. et al. Chagas disease knocks on our door: a cross-sectional study among Latin American immigrants in Milan, Italy. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 24, n. 12, p. 6, Dec 2018.



APOSTOLOU, T.; KINTZIOS, S. Cell-to-Cell Communication Evidence of Near-Instantaneous Distant, Non-Chemical Communication between Neuronal (Human SK-N-SH Neuroblastoma) Cells by Using a Novel Bioelectric Biosensor. **Journal of Consciousness Studies**, v. 25, n. 9-10, p. 62-74, Sep-Oct 2018.

APT, W. et al. Guías clínicas de la enfermedad de Chagas: Parte II. Enfermedad de Chagas en el adulto, la infancia y adolescencia. v. 25, n. 3, p. 194-199, 2008.

APT, W. et al. Guías clínicas de la enfermedad de Chagas: Parte I. Introducción y epidemiología. v. 25, n. 3, p. 189-193, 2008.

APT, W. et al. Guías clínicas de la enfermedad de Chagas: Parte IV. Enfermedad de Chagas en pacientes inmunocomprometidos. v. 25, n. 4, p. 289-292, 2008.

APT, W. et al. Part V. Laboratory diagnosis of Chagas disease. **Revista Chilena De Infectología**, v. 25, n. 5, p. 380-383, Oct 2008.

ARAUJO, P. F. et al. Sexual transmission of American trypanosomiasis in humans: a new potential pandemic route for Chagas parasites. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 6, p. 437-446, 2017.

ASL, H. Y.; MANTHIRAM, A. Mass Transfer of Divalent Ions in an Oxide Host: Comparison of Mg²⁺ and Zn²⁺ Diffusion in Hexagonal K_xW₃O₉ Bronze. **Chemistry of Materials**, v. 31, n. 7, p. 2296-2307, Apr 2019.

ATIF, S. M.; HUSSAIN, S.; SAGHEER, M. Effect of Thermal Radiation and Variable Thermal Conductivity on Magnetohydrodynamics Squeezed Flow of Carreau Fluid Over a Sensor Surface. **Journal of Nanofluids**, v. 8, n. 4, p. 806-816, Apr 2019.

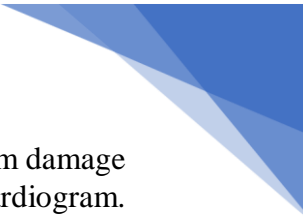
AZEVEDO, E. D. N. et al. Binding capacity of mannose-binding lectin (MBL) is associated with the severity of chronic Chagas cardiomyopathy. **Parasitology International**, v. 67, n. 5, p. 593-596, Oct 2018.

BALOUZ, V.; AGUERO, F.; BUSCAGLIA, C. A. Chagas Disease Diagnostic Applications: Present Knowledge and Future Steps. In: ROLLINSON, D. e STOTHARD, J. R. (Ed.). **Advances in Parasitology, Vol 97**. San Diego: Elsevier Academic Press Inc, v.97, 2017. p.1-45. (Advances in Parasitology). ISBN 978-0-12-811559-6; 978-0-12-811558-9.

BALOUZ, V. et al. The Trypomastigote Small Surface Antigen from *Trypanosoma cruzi* Improves Treatment Evaluation and Diagnosis in Pediatric Chagas Disease. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 55, n. 12, p. 3444-3453, Dec 2017.

BANDARA, A. B. et al. Identification of *Histophilus somni* by a nanomaterial optical fiber biosensor assay. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 30, n. 6, p. 821-829, Nov 2018.

BARFIELD, C. A. et al. A Highly Sensitive Rapid Diagnostic Test for Chagas Disease That Utilizes a Recombinant *Trypanosoma cruzi* Antigen. **Ieee Transactions on Biomedical Engineering**, v. 58, n. 3, p. 814-817, Mar 2011.



BARROS, M. V. L. et al. Doppler tissue imaging to evaluate early myocardium damage in patients with undetermined form of Chagas' disease and normal echocardiogram. **Echocardiography-a Journal of Cardiovascular Ultrasound and Allied Techniques**, v. 18, n. 2, p. 131-136, Feb 2001.

BARTSCH, S. M. et al. The economic value of identifying and treating Chagas disease patients earlier and the impact on *Trypanosoma cruzi* transmission. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 11, p. 22, Nov 2018.

BELLUZO, M. S. et al. Favorably orienting recombinant proteins to develop amperometric biosensors to diagnose Chagas' disease. **Analytical Biochemistry**, v. 408, n. 1, p. 86-94, Jan 2011.

BENZIGER, C. P.; RIBEIRO, A. L. P.; NARULA, J. After 100 Years, the Diagnosis, Treatment, and Control of Chagas Disease Remains a Challenge. **Global Heart**, v. 10, n. 3, p. 137-138, Sep 2015.

BERN, C. Chagas' Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 5, p. 456-466, Jul 2015.

BERTOK, T. et al. Advanced impedimetric biosensor configuration and assay protocol for glycoprofiling of a prostate oncomarker using Au nanoshells with a magnetic core. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 131, p. 24-29, Apr 2019.

BESTETTI, R. B.; GARCIA, M. E.; RESTINI, C. B. A. Chagas' Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 19, p. 1881-1881, Nov 2015.

BESTETTI, R. B.; RESTINI, C. B. A.; COUTO, L. B. Carlos Chagas Discoveries as a Drop Back to Scientific Construction of Chronic Chagas Heart Disease. **Arquivos Brasileiros De Cardiologia**, v. 107, n. 1, p. 63-70, Jul 2016.


BEZERRA, R. D. et al. Etiological Classification of Stroke in Patients with Chagas Disease Using TOAST, Causative Classification System TOAST, and ASCOD Phenotyping. **Journal of Stroke & Cerebrovascular Diseases**, v. 26, n. 12, p. 2864-2869, Dec 2017.

BOCHARD-VILLANUEVA, B. et al. Diagnostic performance of surface electrocardiogram in early detection of chagasic cardiomyopathy. **Medicina Clinica**, v. 144, n. 6, p. 254-256, Mar 2015.

BODIMEADE, C.; MARKS, M.; MABEY, D. J. C. M. Neglected tropical diseases: elimination and eradication. v. 19, n. 2, p. 157-160, 2019.

BONAKDAR, A. et al. A Novel Capacitance Electrochemical Method for Determination of Trace amounts of t-NMP22 by Adsorptive FFT Continuous Fast Cyclic Voltammetry at Au-Pt Ultramicroelectrode in a Flowing Solution. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 14, n. 4, p. 3168-3179, Apr 2019.

BOSCH, L. et al. Cystic fibrosis carriership and tuberculosis: hints toward an evolutionary selective advantage based on data from the Brazilian territory. **Bmc Infectious Diseases**, v. 17, p. 8, May 2017.



BOSCH, M. E. et al. Determination of paracetamol: Historical evolution. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 42, n. 3, p. 291-321, Sep 2006.

BOYDEN, S. V. J. J. O. E. M. The adsorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by antiprotein sera. v. 93, n. 2, p. 107-120, 1951.

BRANDAO, E. et al. Neglected tropical diseases in Brazilian children and adolescents: data analysis from 2009 to 2013. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 6, p. 10, Nov 2017.

BRANDÃO, R. D. A. D. Evolução e Tratamento da Miocardiopatia Chagásica Crônica. 2013.

BRONFEN, E. et al. Isolamento de amostras do Trypanosoma cruzi por xenodiagnóstico e hemocultura de pacientes na fase crônica da doença de Chagas. v. 84, n. 2, p. 237-240, 1989.

BRYAN, C. F. et al. The risk for Chagas' disease in the Midwestern United States organ donor population is low. **Clinical Transplantation**, v. 18, p. 12-15, 2004.

BUFFON, E.; STRADIOTTO, N. R. Electrochemical sensor based on molecularly imprinted poly(ortho-phenylenediamine) for determination of hexahydrofarnesol in aviation biokerosene. **Sensors and Actuators B-Chemical**, v. 287, p. 371-379, May 2019.

BURLE-CALDAS, G. D. et al. Expanding the tool box for genetic manipulation of Trypanosoma cruzi. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 203, n. 1-2, p. 25-33, Sep-Oct 2015.

CALDAS, I. S. et al. Parasitaemia and parasitic load are limited targets of the aetiological treatment to control the progression of cardiac fibrosis and chronic cardiomyopathy in Trypanosoma cruzi-infected dogs. **Acta Tropica**, v. 189, p. 30-38, Jan 2019.

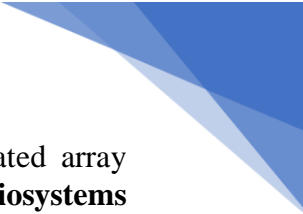
CAMANDAROBA, E. L. P.; PINHEIRO LIMA, C. M.; ANDRADE, S. G. Oral transmission of Chagas disease: importance of Trypanosoma cruzi biodeme in the intragastric experimental infection. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 44, n. 2, p. 97-103, 2002.

CAMARGO, M. E. J. R. D. I. D. M. T. D. S. P. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of Trypanosoma cruzi in a slide test. v. 8, n. 5, p. 227-34, 1966.

CAMPOS, B. R. et al. TRIPANOSSOMOSE AMERICANA: uma revisão sistemática. v. 1, n. 2, p. 73-80, 2017.

CAMPOS, F. M. F. et al. Usefulness of FC-TRIPLEX Chagas/Leish IgG1 as confirmatory assay for non negative results in blood bank screening of Chagas disease. **Journal of Immunological Methods**, v. 455, p. 34-40, Apr 2018.

CAMPUZANO, S.; YANEZ-SEDENO, P.; PINGARRON, J. M. Electrochemical Biosensing for the Diagnosis of Viral Infections and Tropical Diseases. **Chemelectrochem**, v. 4, n. 4, p. 753-777, Apr 2017.



CAO, Y. Y. et al. An electrochemical immunosensor based on interdigitated array microelectrode for the detection of chlorpyrifos. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 38, n. 2, p. 307-313, Feb 2015.

CARDOSO, M. S.; REIS-CUNHA, J. L.; BARTHOLOMEU, D. C. Evasion of the Immune Response by *Trypanosoma cruzi* during Acute Infection. **Frontiers in Immunology**, v. 6, p. 15, Jan 2016.

CARLIER, Y. et al. Congenital Chagas disease: an update. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 3, p. 363-368, 2015.

CARLIER, Y.; TRUYENS, C. Maternal–fetal transmission of *Trypanosoma cruzi*. In: (Ed.). **American Trypanosomiasis**: Elsevier, 2010. p.539-581.

CARNEVALI, V. et al. Prevalence of *Trypanosoma cruzi* and organ alterations in virginia opossums (*Didelphis virginiana*) from western Mexico - short communication. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 65, n. 4, p. 505-509, Dec 2017.

CAROD-ARTAL, F. J. et al. American trypanosomiasis (Chagas' disease): an unrecognised cause of stroke. **Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry**, v. 74, n. 4, p. 516-518, Apr 2003.

CARRASCO, H. A. et al. Biochemical characterization of myocardial damage in chronic Chagas' disease. **Clinical Cardiology**, v. 20, n. 10, p. 865-869, Oct 1997.

CARVALHO, M. E. D. et al. Programa de Controle da Doença de Chagas no Estado de São Paulo: aspectos sorológicos e entomológicos de inquéritos entre escolares de ensino fundamental. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, p. 95-106, 2011.


CAVALCANTI, M. P. C.; DE MIRANDA GOMES, Y. J. R. D. P. T. J. O. T. P. Avanços biotecnológicos para o diagnóstico das doenças infecciosas e parasitárias. v. 37, n. 1, p. 01-14, 2008.

CERONE, M. et al. Discovery of Sustainable Drugs for Neglected Tropical Diseases: Cashew Nut Shell Liquid (CNSL)-Based Hybrids Target Mitochondrial Function and ATP Production in *Trypanosoma brucei*. **Chemmedchem**, v. 14, n. 6, p. 621-635, Mar 2019.

CHANG, J. H. et al. Transport characteristics and removal efficiency of copper ions in the electrodialysis process under electroconvection operation. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 112, p. 235-242, Nov 2017.

CHEN, L. H. et al. A novel label-free electrochemical immunosensor modified by glutathione and hyaluronic acid for the ultrasensitive and ultraspecific detection of brucellosis in dilute serum. **Sensors and Actuators B-Chemical**, v. 287, p. 510-516, May 2019.

CHEN, Q. L. et al. Recent progress in nanomaterial-based assay for the detection of phytotoxins in foods. **Food Chemistry**, v. 277, p. 162-178, Mar 2019.



CHEN, X. Q. et al. Effect of Light and Voltage on Electrochemical Impedance Spectroscopy of Perovskite Solar Cells: An Empirical Approach Based on Modified Randles Circuit. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 123, n. 7, p. 3968-3978, Feb 2019.

CHEVILLARD, C. et al. Disease Tolerance and Pathogen Resistance Genes May Underlie *Trypanosoma cruzi* Persistence and Differential Progression to Chagas Disease Cardiomyopathy. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 14, Dec 2018.

CHIPOLINE, I. C.; PACHECO, P. A. F. J. R. V. D. Q. Prêmio Nobel de Medicina de 2015: Reconhecida contribuição contras doenças negligenciadas. v. 8, n. 3, p. 1032-1037, 2016.

CISZEWSKI, M. et al. Review of the Selected Carbon-Based Materials for Symmetric Supercapacitor Application. **Journal of Electronic Materials**, v. 48, n. 2, p. 717-744, Feb 2019.

COLTRO, W. K. T. et al. Microfluidic devices with integrated dual-capacitively coupled contactless conductivity detection to monitor binding events in real time. **Sensors and Actuators B-Chemical**, v. 192, p. 239-246, Mar 2014.

CONNERS, E. E. et al. Zika Virus Infection Among Pregnant Women and Their Neonates in New York City, January 2016-June 2017. **Obstetrics and Gynecology**, v. 132, n. 2, p. 487-495, Aug 2018.

CORONADO, X. et al. Variation in *Trypanosoma cruzi* clonal composition detected in blood patients and xenodiagnosis triatomines: Implications in the molecular epidemiology of Chile. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 74, n. 6, p. 1008-1012, Jun 2006.

CORTINA, M. E. et al. Electrochemical magnetic microbeads-based biosensor for point-of-care serodiagnosis of infectious diseases. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 80, p. 24-33, Jun 2016.

COSTA, M. et al. Doença de Chagas: Uma revisão bibliográfica. v. 2, n. 1, 2013.


COURA, J. R. Chagas disease: what is known and what is needed - A background article. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 113-122, 2007.

COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. **Acta Tropica**, v. 115, n. 1-2, p. 5-13, Jul-Aug 2010.

COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. J. R. D. S. B. D. M. T. Chagas disease: What is known and what should be improved: a systemic review. v. 45, n. 3, p. 286-296, 2012.

CUCUNUBA, Z. M. et al. Complementary Paths to Chagas Disease Elimination: The Impact of Combining Vector Control With Etiological Treatment. **Clinical Infectious Diseases**, v. 66, p. S293-S300, Jun 2018.

CUI, G. W. et al. Preparation and Characterization of All-Solid-State Zinc Ion Selective Electrode. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 46, n. 10, p. 1669-1676, Oct 2018.



DA SILVA, A. F.; DA LUZ JÚNIOR, G. E. PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA: POTENCIALIDADES DE DIAGNÓSTICO PARA DOENÇAS DE CHAGAS. **Revista Brasileira de Inovação Tecnológica em Saúde**, v. 6, n. 2, p. 15-31, 2016.

DA SILVA, A. M. et al. *Patologias das Doenças 6*. Atena Editora, 2019.

DAMASCENO, F. S. et al. Memantine, an Antagonist of the NMDA Glutamate Receptor, Affects Cell Proliferation, Differentiation and the Intracellular Cycle and Induces Apoptosis in *Trypanosoma cruzi*. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 2, p. 9, Feb 2014.

DAMHORST, G. L. et al. Microfluidics and Nanotechnology for Detection of Global Infectious Diseases. **Proceedings of the Ieee**, v. 103, n. 2, p. 150-160, Feb 2015.

DE ALBUQUERQUE, J. B. et al. Oral versus intragastric inoculation: Similar Pathways of *Trypanosoma cruzi* experimental infection? From Target Tissues, Parasite evasion, and immune Response. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 9, Jul 2018.

DE ALMEIDA, J. et al. Molecular Modeling Studies on the Interactions of Aflatoxin B1 and Its Metabolites with Human Acetylcholinesterase. Part II: Interactions with the Catalytic Anionic Site (CAS). **Toxins**, v. 10, n. 10, p. 11, Oct 2018.

DE ANDRADE, M. F. et al. Involvement of neutrophils in Chagas disease pathology. **Parasite Immunology**, v. 40, n. 12, p. 8, Dec 2018.

DE BARROS VASCONCELOS, A. S. O. et al. Doença de Chagas: situação vetorial no município de Limoeiro do Norte–CE, no período de 2006 a 2009. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v. 72, n. 4, p. 295-301, 2013.

DE CHAGAS, G. T. D. D. J. R. D. P. T. J. O. T. P. NORMAS DE SEGURANÇA PARA INFECÇÕES ACIDENTAIS COM O *Trypanosoma cruzi*, AGENTE CAUSADOR DA DOENÇA DE CHAGAS. **Revista de Patologia Tropical/Journal of Tropical Pathology**

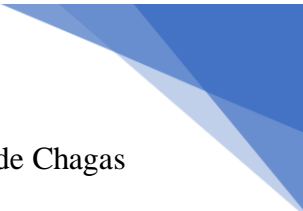
v. 26, n. 1, 1997.

DE FÁTIMA OLIVEIRA, M. et al. Tratamento etiológico da doença de Chagas no Brasil. v. 37, n. 3, p. 209-228, 2008.

DE FUENTES-VICENTE, J. A. et al. What makes an effective Chagas disease vector? Factors underlying *Trypanosoma cruzi*-triatomine interactions. **Acta Tropica**, v. 183, p. 23-31, Jul 2018.

DE MARCHI, C. R.; AMATO, V.; DE ALMEIDA, I. C. Behavior of the chemiluminescent ELISA method in relation to results considered discordant via three conventional techniques for diagnosing Chagas disease. **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical**, v. 40, n. 1, p. 68-70, Jan-Feb 2007.

DE MATTOS, E. C. et al. Molecular detection of *Trypanosoma cruzi* in acai pulp and sugarcane juice. **Acta Tropica**, v. 176, p. 311-315, Dec 2017.



DE SOUZA, D. D. S. M. et al. O eletrocardiograma na fase aguda da Doença de Chagas por transmissão oral. v. 26, n. 2, p. 127-130, 2013.

DE SOUZA, G. B. et al. Natural infection by *Trypanosoma cruzi* in dogs located in Itubera, Southern Bahia, Brazil. **Semina-Ciencias Agrarias**, v. 39, n. 2, p. 881-886, 2018.

DE SOUZA, T. M. et al. Cytotoxic and Tripanocide Activities of *Pityrogramma calomelanos* (L.) Link. **American Fern Journal**, v. 102, n. 3, p. 198-207, Jul-Sep 2012.

DECOTE-RICARDO, D. et al. Implications of Apoptosis for the Pathogenesis of *Trypanosoma cruzi* Infection. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 5, May 2017.

DERKUS, B. et al. Myelin basic protein immunosensor for multiple sclerosis detection based upon label-free electrochemical impedance spectroscopy. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 46, p. 53-60, Aug 2013.

DIAS, J. C. P.; AMATO NETO, V.; LUNA, E. J. D. A. J. R. D. S. B. D. M. T. Alternative transmission mechanisms of *Trypanosoma cruzi* in Brazil and proposals for their prevention. v. 44, n. 3, p. 375-379, 2011.

DIAS, J. C. P. et al. II Consenso Brasileiro em doença de Chagas, 2015. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**

v. 25, p. 7-86, 2016.

DIAS, J. C. P. et al. Brazilian consensus on Chagas disease, 2015. v. 25, n. SPE, p. 7-86, 2016.

DIAS, J. V. L. et al. Conhecimentos sobre triatomíneos e sobre a doença de Chagas em localidades com diferentes níveis de infestação vetorial. **Ciência Saúde Coletiva**

v. 21, p. 2293-2304, 2016.

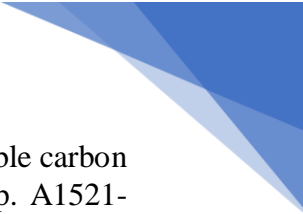
DIAZ-BELLO, Z. et al. A confirmatory diagnosis of antibodies anti-*Trypanosoma cruzi* in donors referred by blood banks in Venezuela. **Investigacion Clinica**, v. 49, n. 2, p. 141-150, Jun 2008.

DIAZ, M. L. et al. Acute chagas outbreaks: molecular and biological features of *Trypanosoma cruzi* isolates, and clinical aspects of acute cases in Santander, Colombia. **Parasites & Vectors**, v. 8, p. 14, Nov 2015.

DIGUTA, C. F. et al. Development of a qPCR assay for specific quantification of *Botrytis cinerea* on grapes. **Fems Microbiology Letters**, v. 313, n. 1, p. 81-87, Dec 2010.

DINCAU, B. M. et al. Vortex-free high-Reynolds deterministic lateral displacement (DLD) via airfoil pillars. **Microfluidics and Nanofluidics**, v. 22, n. 12, p. 9, Dec 2018.

DINIZ, F. B. et al. Impedimetric evaluation for diagnosis of Chagas' disease: antigen-antibody interactions on metallic electrodes. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 19, n. 2, p. 79-84, Nov 2003.



DOI, T. et al. Lithium-ion transfer at an electrolyte/heat-treated nongraphitizable carbon electrode interface. **Journal of the Electrochemical Society**, v. 152, n. 8, p. A1521-A1525, 2005.

DONOSO, M. I. et al. Temporal fluctuation in shrub species preferences of two native rodents: The effect of infection status on habitat use. **Austral Ecology**, v. 41, n. 5, p. 512-518, Aug 2016.

DOS REIS, L. L. et al. Changes in the epidemiology of visceral leishmaniasis in Brazil from 2001 to 2014. **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical**, v. 50, n. 5, p. 638-645, Sep-Oct 2017.

DOS SANTOS, F. R. et al. Systematic neonatal screening for congenital Chagas disease in Northeast Brazil: prevalence of *Trypanosoma cruzi* infection in the Southern region of Sergipe. **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical**, v. 51, n. 3, p. 310-317, Apr-Jun 2018.

DOU, Z. D. et al. Potentiometric Investigation of the Thermodynamic Properties of Mixed Electrolyte Systems at 298.2 K: CsF + CsBr + H₂O and CsF + CsNO₃ + H₂O. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 63, n. 10, p. 3801-3808, Oct 2018.

DUDEK, M. et al. Ba_{0.95}Ca_{0.05}Ce_{0.9}Y_{0.1}O₃ as an electrolyte for proton-conducting ceramic fuel cells. **Electrochimica Acta**, v. 304, p. 70-79, May 2019.

DURRANI, S. K. et al. Thermal, structural, and impedance analysis of nanocrystalline magnesium chromite spinel synthesized via hydrothermal process. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 116, n. 1, p. 309-320, Apr 2014.

EGUEZ, K. E. et al. Rapid diagnostic tests duo as alternative to conventional serological assays for conclusive Chagas disease diagnosis. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 4, p. 11, Apr 2017.

ERGUNAY, K. et al. Performance of Various Commercial Assays for the Detection of Toscana Virus Antibodies. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 11, n. 6, p. 781-787, Jun 2011.

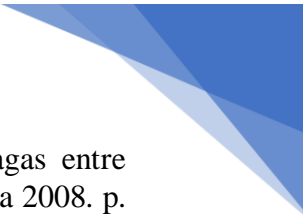
FERNANDES, C. F. C. et al. Camelid Single-Domain Antibodies As an Alternative to Overcome Challenges Related to the Prevention, Detection, and Control of neglected Tropical Diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 8, Jun 2017.

FERRAZ, L. R. D. et al. Technological innovation strategies for the specific treatment of Chagas disease based on Benzimidazole. **Acta Tropica**, v. 185, p. 127-132, Sep 2018.

FERREIRA, A. et al. Electrochemical and spectroscopic characterization of screen-printed gold-based electrodes modified with self-assembled monolayers and Tc85 protein. v. 634, n. 2, p. 111-122, 2009.

FERREIRA, A. A. P. et al. Immunosensor for the diagnosis of Chagas' disease. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 21, n. 1, p. 175-181, Jul 2005.

FERREIRA, E. C. et al. Phosphorus protects cardiac tissue by modifying the immune response in rats infected by *Trypanosoma cruzi*. **Cytokine**, v. 102, p. 102-106, Feb 2018.



FERREIRA FILHO, J. C. R. et al. Soropositividade para doença de Chagas entre doadores de sangue em Araraquara, Estado de São Paulo, no período de 2004 a 2008. p. 110-112, 2011.

FERREIRA, I. D. L. M.; SILVA, T. P. T. J. R. D. S. B. D. M. T. Transmission elimination of Chagas' disease by *Triatoma infestans* in Brazil: an historical fact. v. 39, n. 5, p. 507-509, 2006.

FERREIRA, M. R.; DANTAS, J. M.; SALGUEIRO, C. A. The triheme cytochrome PpcF from *Geobacter metallireducens* exhibits distinct redox properties. **Febs Open Bio**, v. 8, n. 12, p. 1897-1910, Dec 2018.

FERREIRA, R. T. B. et al. Detection and genotyping of *Trypanosoma cruzi* from acai products commercialized in Rio de Janeiro and Para, Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 11, p. 11, Apr 2018.

FERRER, E. et al. Comparison between immunological and molecular techniques for the diagnosis of Chagas disease. **Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica**, v. 31, n. 5, p. 277-282, May 2013.

FIGUEIREDO, A. et al. Electrical detection of dengue biomarker using egg yolk immunoglobulin as the biological recognition element. **Scientific reports**, v. 5, p. 7865, 2015.

FLORES-CHAVEZ, M. et al. Comparison of conventional and non-conventional serological tests for the diagnosis of imported Chagas disease in Spain. **Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica**, v. 28, n. 5, p. 284-293, May 2010.

FONSECA-OLIVEIRA, T. S. et al. Biological study of *Trypanosoma caninum* under co-culture with different feeder layer cells. **Acta Tropica**, v. 187, p. 44-50, Nov 2018.

FREITAS, E. C. et al. Analysis of the seroprevalence of and factors associated with Chagas disease in an endemic area in northeastern Brazil. **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical**, v. 50, n. 1, p. 44-51, Jan-Feb 2017.

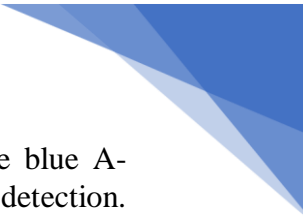
FREITAS, G. D. et al. Imunoglobulinas na fase crônica da doença de Chagas. v. 74, n. 2, p. 183-190, 1976.

FREITAS, J. Diagnóstico de laboratório da moléstia de Chagas. 1961.

FREITAS, J. D. et al. Primeiras verificações de transmissão acidental da moléstia de Chagas ao homem por transfusão de sangue. **Rev Paul Med**, v. 40, n. 1, p. 36-40, 1952.

FREITAS, Y. B. N. et al. Natural infection by *Trypanosoma cruzi* in triatomines and seropositivity for Chagas disease of dogs in rural areas of Rio Grande do Norte, Brazil. **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical**, v. 51, n. 2, p. 190-197, Mar-Apr 2018.

GADELHA, A. Á. M. Avaliação do desempenho do Kit EIE recombinante-chagas-Biomanguinhos frente ao ELISA convencional e ao teste de hemaglutinação indireta. 2003.



GAO, Y. S. et al. Label-free electrochemical immunosensor based on Nile blue A-reduced graphene oxide nanocomposites for carcinoembryonic antigen detection. **Analytical Biochemistry**, v. 500, p. 80-87, May 2016.

GARCIA-QUINTANILLA, M. et al. Carrion's disease: more than a neglected disease. **Parasites & Vectors**, v. 12, p. 12, Mar 2019.

GARCIA, E. et al. Diagnosis of American Trypanosomiasis (Chagas-disease) by the new complement-fixation test. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 4, p. 1034-1035, Apr 1995.

GARCIA, V. S. et al. Optimisation and standardisation of an immunoagglutination assay for the diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection based on latex-(recombinant antigen) complexes. **Tropical Medicine & International Health**, v. 19, n. 1, p. 37-46, Jan 2014.

GARZON, M. I. et al. Reactivation of Chagas Disease in a Patient With Follicular Lymphoma Diagnosed by Means of Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 2, n. 2, p. 3, Spr 2015.

GHALAMI-CHOOBAR, B.; POURHAJI-MOHAMMADI, F.; MOSSAYYEBZADEH-SHALKOOHI, P. Thermodynamic study of (sodium bromide plus monosodium aspartate plus water) system based on potentiometric measurements at $T = (298.2 \text{ and } 310.2) \text{ K}$. **Fluid Phase Equilibria**, v. 445, p. 25-34, Aug 2017.

GHINNIRE, M. et al. Physical Properties and Theoretical Study of $\text{Ni}_x\text{Co}_{3-x}\text{O}_4$ ($0 \leq x \leq 1.5$) Nanostructures as High-Performance Electrode Materials for Supercapacitors. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 19, n. 8, p. 4481-4494, Aug 2019.

GHOLIVAND, M. B.; SHAMSIPUR, M.; EHZARI, H. Cetirizine dihydrochloride sensor based on nano composite chitosan, MWCNTs and ionic liquid. **Microchemical Journal**, v. 146, p. 692-700, May 2019.


GHORBANI, F. et al. Study of alpha-Amylase Inhibitors among Different Bean Cultivars and Evaluation of their Effectiveness Compared with a Commercial Product using In Vitro/In Vivo Experimental Systems. **Journal of Research in Medical and Dental Science**, v. 6, n. 1, p. 381-391, Feb 2018.

GINER-SANZ, J. J.; ORTEGA, E. M.; PEREZ-HERRANZ, V. Optimization of the Perturbation Amplitude for EIS Measurements Using a Total Harmonic Distortion Based Method. **Journal of the Electrochemical Society**, v. 165, n. 10, p. E488-E497, 2018.

GOMES, C. et al. American trypanosomiasis and Chagas disease: Sexual transmission. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 81, p. 81-84, Apr 2019.

GOMES, F. O. et al. Electroanalytical characterization of the direct *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* nitric oxide reductase-catalysed nitric oxide and dioxygen reduction. **Bioelectrochemistry**, v. 125, p. 8-14, Feb 2019.

GOMES, L. I.; ENK, M. J.; RABELLO, A. Diagnosing schistosomiasis: where are we? **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical**, v. 47, n. 1, p. 3-11, Jan-Feb 2014.



GOMES, Y. M. et al. Serodiagnosis of chronic Chagas infection by using EIE-Recombinant-Chagas-Biomanguinhos kit. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 4, p. 497-501, May 2001.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. J. R. B. D. E. Visceral leishmaniasis in Brazil: current status, challenges and prospects. v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.

GONZALEZ-LINARES, L. et al. New Method of Production and Characterization of Haemozoin and B-Haemozoin from *Meccus longipennis*. **Iranian Journal of Parasitology**, v. 14, n. 1, p. 59-67, Jan-Mar 2019.

GONZALEZ, L. et al. Immunoserology and molecular techniques for diagnosis of Chagas' disease: rapid systematic review. **Acta Bioquimica Clinica Latinoamericana**, v. 51, n. 1, p. 63-74, 2017.

GOULET, S. et al. Prevalence and Mode of Inheritance of the Dal Blood Group in Dogs in North America. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 31, n. 3, p. 751-758, May-Jun 2017.

GRANJON, E. et al. Development of a Novel Multiplex Immunoassay Multi-cruzi for the Serological Confirmation of Chagas Disease. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 4, p. 15, Apr 2016.

GRAY, E. B. et al. Reactivation of Chagas disease among heart transplant recipients in the United States, 2012-2016. **Transplant Infectious Disease**, v. 20, n. 6, p. 8, Dec 2018.

GUHL, F. J. R. B. Enfermedad de Chagas: Realidad y perspectivas. v. 20, n. 3, p. 228-234, 2009.

GUIN, S. K. et al. Template- and Additive-free Electrosynthesis and Characterization of Spherical Gold Nanoparticles on Hydrophobic Conducting Polydimethylsiloxane. **Chemistry-an Asian Journal**, v. 12, n. 13, p. 1615-1624, Jul 2017.


GURGEL-GONCALVES, R. et al. Automated identification of insect vectors of Chagas disease in Brazil and Mexico: the Virtual Vector Lab. **Peerj**, v. 5, p. 23, Apr 2017.


GUZMAN, I.; THORPE, S. J.; PAPANGELAKIS, V. G. Redox potential measurements in the H₂SO₄-FeSO₄-Fe-2(SO₄)(₃)-H₂O system at high temperature using an Ir electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 799, p. 399-405, Aug 2017.

HAJI-HASHEMI, H. et al. Label-free electrochemical immunosensor based on electrodeposited Prussian blue and gold nanoparticles for sensitive detection of citrus bacterial canker disease. **Sensors and Actuators B-Chemical**, v. 275, p. 61-68, Dec 2018.

HAJRA, S. et al. Development and excitation performance of lead free electronic material: Eu and Fe doped Bi_{0.5}Na_{0.5}TiO₃ for filter application. **Materials Research Express**, v. 6, n. 7, p. 14, Jul 2019.

HARK, E. et al. Electrochemical impedance study of hydrogen evolution on Bi(001) electrode in the HClO₄ aqueous solutions. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 13, n. 5, p. 745-754, May 2009.

- 
- HASANJANI, H. R. A.; ZAREI, K. Electrochemical sensor for ultrasensitive determination of ceftazidime using hollow platinum nanoparticles/reduced graphene oxide/pencil graphite electrode. **Chemical Papers**, v. 72, n. 8, p. 1935-1944, Aug 2018.
- HASTAK, R. S. et al. All solid supercapacitor based on activated carbon and poly 2,5-benzimidazole for high temperature application. **Electrochimica Acta**, v. 59, p. 296-303, Jan 2012.
- HEINZE, J. J. A. C. I. E. I. E. Cyclic voltammetry—"electrochemical spectroscopy". *New analytical methods* (25). v. 23, n. 11, p. 831-847, 1984.
- HERNANDEZ, C. et al. Comparison of parasite loads in serum and blood samples from patients in acute and chronic phases of Chagas disease. **Parasitology**, v. 145, n. 14, p. 1837-1843, Dec 2018.
- HILLEMANN, M. R.; WERNER, J. H. Influence of non-specific inhibitor on the diagnostic hemagglutination-inhibition test for influenza. **Journal of Immunology**, v. 71, n. 2, p. 110-117, 1953.
- HOFF, R. et al. Prevalence of parasitemia and seroreactivity to *Trypanosoma cruzi* in a rural population of northeast Brazil. v. 28, n. 3, p. 461-466, 1979.
- HOLLAND-CUNZ, M. V.; FRIEDL, J.; STIMMING, U. Anion effects on the redox kinetics of positive electrolyte of the all-vanadium redox flow battery. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 819, p. 306-311, Jun 2018.
- HU, M. et al. Label-free electrochemical immunosensor based on AuNPs/Zn/Ni-ZIF-8-800@graphene composites for sensitive detection of monensin in milk. **Sensors and Actuators B-Chemical**, v. 288, p. 571-578, Jun 2019.
- HUANG, B. et al. Study of NiO cathode modified by rare earth oxide additive for MCFC by electrochemical impedance spectroscopy. **Electrochimica Acta**, v. 49, n. 28, p. 5055-5068, Nov 2004.
- HUANG, M. X. et al. One-Step Hydrothermal Synthesis of SnO₂@Carbon Composites with Super Lithium Ions Storage Performances. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 19, n. 8, p. 4556-4564, Aug 2019.
- HUANG, Y. T.; ZHANG, Y. F. Influence of the electrochemical properties of vanadium oxides on specific capacitance by molybdenum doping. **Bulletin of Materials Science**, v. 42, n. 1, p. 12, Feb 2019.
- HWANG, J.; MATSUMOTO, K.; HAGIWARA, R. Symmetric Cell Electrochemical Impedance Spectroscopy of Na₂FeP₂O₇ Positive Electrode Material in Ionic Liquid Electrolytes. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 122, n. 47, p. 26857-26864, Nov 2018.
- INÁCIO, M.; INVERNIZZI, N. J. A. S. H.; SCIENCES, S. Nanotecnologias para doenças negligenciadas no Brasil: trajetórias de pesquisa, incentivos e perspectivas. v. 41, n. 1, p. e45769, 2019.



IQBAL, S. S. et al. A review of molecular recognition technologies for detection of biological threat agents. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 15, n. 11-12, p. 549-578, Dec 2000.

JANIYAK, A. et al. No Time to Waste: Transcriptome Study Reveals that Drought Tolerance in Barley May Be Attributed to Stressed-Like Expression Patterns that Exist before the Occurrence of Stress. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 25, Jan 2018.

JANISSEN, R. et al. InP Nanowire Biosensor with Tailored Biofunctionalization: Ultrasensitive and Highly Selective Disease Biomarker Detection. **Nano Letters**, v. 17, n. 10, p. 5938-5949, Oct 2017.

JASIELEC, J. J. et al. Comparison of different approaches to the description of the detection limit of ion-selective electrodes. **Electrochimica Acta**, v. 55, n. 22, p. 6836-6848, Sep 2010.

JIA, H. Y. et al. An Electrochemical Immunosensor Based on Microfluidic Chip for Detection of Chlorpyrifos. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 10, n. 10, p. 8750-8758, Oct 2015.

JIANG, Z. et al. Effect of submicron Sn and heat treatment temperature on corrosion resistance of Ni-P composite coatings. **Materials Research Express**, v. 6, n. 7, p. 10, Jul 2019.

JUNQUEIRA, A. C. et al. Comparison of the polymerase chain reaction with two classical parasitological methods for the diagnosis of Chagas disease in an endemic region of north-eastern Brazil. v. 90, n. 2, p. 129-132, 1996.

KAHLERT, H. Functionalized carbon electrodes for pH determination. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 12, n. 10, p. 1255-1266, Oct 2008.

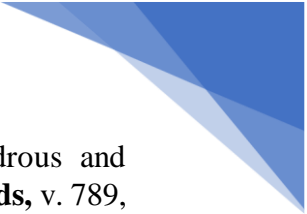
KALAIYARASAN, G.; JOSEPH, J. Cholesterol derived carbon quantum dots as fluorescence probe for the specific detection of hemoglobin in diluted human blood samples. **Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications**, v. 94, p. 580-586, Jan 2019.

KASHYAP, D. et al. Multi walled carbon nanotube and polyaniline coated pencil graphite based bio-cathode for enzymatic biofuel cell. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 40, n. 30, p. 9515-9522, Aug 2015.

KATZ, E.; WILLNER, I. Probing biomolecular interactions at conductive and semiconductive surfaces by impedance spectroscopy: Routes to impedimetric immunosensors, DNA-Sensors, and enzyme biosensors. **Electroanalysis**, v. 15, n. 11, p. 913-947, Jul 2003.

KESSLER, R. L. et al. Recently differentiated epimastigotes from *Trypanosoma cruzi* are infective to the mammalian host. **Molecular Microbiology**, v. 104, n. 5, p. 712-736, Jun 2017.

KHARITONOV, A. B. et al. Probing of bioaffinity interactions at interfaces using impedance spectroscopy and chronopotentiometry. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 487, n. 2, p. 133-141, Jun 2000.



KIM, B. C. et al. Efficient supercapattery behavior of mesoporous hydrous and anhydrous cobalt molybdate nanostructures. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 789, p. 256-265, Jun 2019.

KIM, Y. H. et al. Evaluation of a Commercial Glycoprotein Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Measuring Vaccine Immunity to Varicella. **Yonsei Medical Journal**, v. 55, n. 2, p. 459-466, Mar 2014.

KIRCHHOFF, L. V. et al. Transfusion-associated Chagas disease (American trypanosomiasis) in Mexico: implications for transfusion medicine in the United States. **Transfusion**, v. 46, n. 2, p. 298-304, Feb 2006.

KRATZ, J. M. et al. Clinical and pharmacological profile of benznidazole for treatment of Chagas disease. **Expert Review of Clinical Pharmacology**, v. 11, n. 10, p. 943-957, 2018.

KUEHN, C. C. et al. Distinctive histopathology and modulation of cytokine production during oral and intraperitoneal *Trypanosoma cruzi* Y strain infection. **Parasitology**, v. 141, n. 7, p. 904-913, Jun 2014.

LAKEY, A. et al. Impedimetric array in polymer microfluidic cartridge for low cost point-of-care diagnostics. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 129, p. 147-154, Mar 2019.

LARIBI, S. et al. Air supply temperature impact on the PEMFC impedance. **Journal of Energy Storage**, v. 17, p. 327-335, Jun 2018.

LEE, G. Y. et al. Chronoamperometry-Based Redox Cycling for Application to Immunoassays. **Acs Sensors**, v. 3, n. 1, p. 106-112, Jan 2018.

LEE, J. H.; GIGER, U.; KIM, H. Y. Kai 1 and Kai 2: Characterization of these dog erythrocyte antigens by monoclonal antibodies. **Plos One**, v. 12, n. 6, p. 13, Jun 2017.

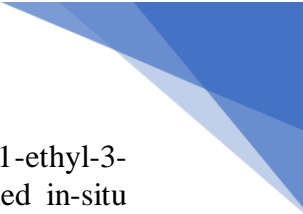
LEITE, F. M. C. et al. Analysis of the female mortality trend due to assault in Brazil, States and Regions. **Ciencia & Saude Coletiva**, v. 22, n. 9, p. 2971-2978, Sep 2017.

LENK, E. J. et al. Socioeconomic benefit to individuals of achieving 2020 targets for four neglected tropical diseases controlled/eliminated by innovative and intensified disease management: Human African trypanosomiasis, leprosy, visceral leishmaniasis, Chagas disease. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 3, p. 28, Mar 2018.

LEPESHEVA, G. I. Design or screening of drugs for the treatment of Chagas disease: what shows the most promise? **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 8, n. 12, p. 1479-1489, Dec 2013.

LEWIS, M. D. et al. Host and parasite genetics shape a link between *Trypanosoma cruzi* infection dynamics and chronic cardiomyopathy. **Cellular Microbiology**, v. 18, n. 10, p. 1429-1443, Oct 2016.

LI, D. et al. Electrochemical Investigation of Coenzyme Q(10) on Silver Electrode in Ethanol Aqueous Solution and Its Determination Using Differential Pulse Voltammetry. **Jala**, v. 21, n. 4, p. 579-589, Aug 2016.



LI, M. G. et al. The electrochemical interface of Ag(111) in 1-ethyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide ionic liquid-A combined in-situ scanning probe microscopy and impedance study. **Electrochimica Acta**, v. 197, p. 282-289, Apr 2016.

LIENEMANN, M. et al. Towards patterned bioelectronics: facilitated immobilization of exoelectrogenic Escherichia coli with heterologous pili. **Microbial Biotechnology**, v. 11, n. 6, p. 1184-1194, Nov 2018.

LIN, J. Y. et al. Diameter effect of silver nanowire doped in activated carbon as thin film electrode for high performance supercapacitor. **Applied Surface Science**, v. 477, p. 257-263, May 2019.

LINDOSO, J. A. L.; LINDOSO, A. NEGLECTED TROPICAL DISEASES IN BRAZIL. **Revista Do Instituto De Medicina Tropical De Sao Paulo**, v. 51, n. 5, p. 247-253, Sep-Oct 2009.

LIU, C. et al. Theoretical assessment of a highly sensitive photonic crystal fibre based on surface plasmon resonance sensor operating in the near-infrared wavelength. **Journal of Modern Optics**, v. 66, n. 1, p. 1-6, Jan 2019.

LOSIEWICZ, B.; JURCZAKOWSKI, R.; LASIA, A. Kinetics of hydrogen underpotential deposition at polycrystalline rhodium in acidic solutions. **Electrochimica Acta**, v. 56, n. 16, p. 5746-5753, Jun 2011.

LUAN, E. X. et al. Silicon Photonic Biosensors Using Label-Free Detection. **Sensors**, v. 18, n. 10, p. 42, Oct 2018.

LUBERT, K. H.; KALCHER, K. History of Electroanalytical Methods. **Electroanalysis**, v. 22, n. 17-18, p. 1937-1946, Sep 2010.


LUQUETTI, A. et al. **Doença de Chagas – Triagem e diagnóstico sorológico em unidades hemoterápicas e laboratórios de saúde público.** Coordenação Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e Aids, 1998. 76.

LUQUETTI, A. O. et al. Congenital transmission of Trypanosoma cruzi in central Brazil. A study of 1,211 individuals born to infected mothers. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 3, p. 369-376, 2015.

LUZ, J. G. et al. Development and evaluation of a SPR-based immunosensor for detection of anti-Trypanosoma cruzi antibodies in human serum. v. 212, p. 287-296, 2015.

LUZ, J. G. G. et al. Development and evaluation of a SPR-based immuno sensor for detection of anti-Trypanosoma cruzi antibodies in human serum. **Sensors and Actuators B-Chemical**, v. 212, p. 287-296, Jun 2015.

LUZ, J. G. G. et al. Applicability of a novel immunoassay based on surface plasmon resonance for the diagnosis of Chagas disease. **Clinica Chimica Acta**, v. 454, p. 39-45, Feb 2016.



LUZ, Z. M. P. J. M. D. I. O. C. Changes in the hemoculture methodology improve the test positivity. v. 94, p. 295-298, 1999.

MA, R. L. et al. Amphiphilic CdTe Quantum Dots@Layered Double Hydroxides/Arachidate Nanocomposite Langmuir-Blodgett Ultrathin Films: Its Assembly and Response Mechanism as VOC Fluorescence Sensors. **Langmuir**, v. 34, n. 38, p. 11354-11363, Sep 2018.

MAÇANEIRO, P. H. C. Levantamento epidemiológico de doenças infectocontagiosas e seus vetores no município de Tijucas-SC. 2018.

MACCRINDLE, C.; SCHWENZER, K.; JOLLEY, M. J. C. C. Particle concentration fluorescence immunoassay: a new immunoassay technique for quantification of human immunoglobulins in serum. v. 31, n. 9, p. 1487-1490, 1985.

MAGALHÃES-SANTOS, I. F. Transmissão oral da Doença de Chagas: breve revisão. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**

v. 13, n. 2, p. 226-235, 2015.

MAGUIRE JH. GORBACH S, B. J., BLACKLOW N. . Trypanosoma. Infectious Diseases. **Filadelfia: Lippincott, Williams & Wilkins**, p. 2327-2334., 2004.

_____. Trypanosoma. Infectious Diseases. **Filadelfia: Lippincott, Williams & Wilkins**, p. 2327-2334, 2004.

MAKARYCHEV-MIKHAILOV, S.; SHVAREV, A.; BAKKER, E. Calcium pulstrodes with 10-fold enhanced sensitivity for measurements in the physiological concentration range. **Analytical Chemistry**, v. 78, n. 8, p. 2744-2751, Apr 2006.

MALAFAIA, G.; RODRIGUES, A. S. D. L. Centenário do descobrimento da doença de Chagas: desafios e perspectivas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 5, p. 483-485, 2010.

MANDAL, N. et al. Point-of-care-testing of alpha-amylase activity in human blood serum. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 124, p. 75-81, Jan 2019.


MARTINS, M.; SEQUEIRA, C. Aspectos relevantes de cronopotenciometria. **Química Nova**, v. 11, p. 464-478, 1988.

MATOS, H. J. D. et al. Cross-reactivity in serological tests between Chagas disease and visceral leishmaniasis in endemic regions for both diseases. v. 6, n. 1, p. 65-68, 2015a.

_____. Reação cruzada nos testes sorológicos entre doença de Chagas e leishmaniose visceral em regiões endêmicas para ambas as doenças. v. 6, n. 1, p. 65-68, 2015b.

MAZZA, S. et al. Transmisión de “Schizotrypanum cruzi” al niño por leche de la madre con enfermedad de Chagas. **Mepra**, v. 28, p. 41-46, 1936.

MENDES, R. S. et al. Epidemiological aspects of canine Chagas disease in the semi-arid region of Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 12, p. 1459-1465, Dec 2013.



MENDES, T. A. D. et al. Identification of Strain-Specific B-cell Epitopes in *Trypanosoma cruzi* Using Genome-Scale Epitope Prediction and High-Throughput Immunoscreening with Peptide Arrays. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 10, p. 13, Oct 2013.

MILLER, H. B. Practical applications of biosensors to patient care. **Aerospace Medicine**, v. 37, n. 3, p. 292-+, 1966.

MISCHLER, P. et al. Environmental and socio-economic risk modelling for Chagas disease in Bolivia. **Geospatial Health**, v. 6, n. 3, p. S59-S66, Sep 2012.

MOHAJERI, M.; CASTANEDA, H.; LAGOUDAS, D. C. Corrosion monitoring of NiTi alloy with small-amplitude potential intermodulation technique. In: NAGUIB, H. E. (Ed.). **Behavior and Mechanics of Multifunctional Materials and Composites Xii**. Bellingham: Spie-Int Soc Optical Engineering, v.10596, 2018. (Proceedings of SPIE). ISBN 978-1-5106-1689-9.

MONTALVO, A. M. et al. Detection and identification of *Leishmania* spp.: application of two hsp70-based PCR-RFLP protocols to clinical samples from the New World. **Parasitology Research**, v. 116, n. 7, p. 1843-1848, Jul 2017.

MONTANARO, V. V. A. et al. Ischemic stroke classification and risk of embolism in patients with Chagas disease. **Journal of Neurology**, v. 263, n. 12, p. 2411-2415, Dec 2016.

MONTESINO, N. L. et al. Search for Antiprotozoal Activity in Herbal Medicinal Preparations; New Natural Leads against Neglected Tropical Diseases. **Molecules**, v. 20, n. 8, p. 14118-14138, Aug 2015.

MORAES, M. L. et al. Immunosensor for the Diagnostics of Autoimmune Hemolytic Anemia (AIHA) Based on Immobilization of a Monoclonal Antibody on a Layer of Silk Fibroin. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 19, n. 7, p. 3772-3776, Jul 2019.

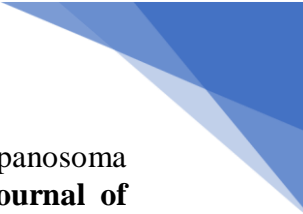
MORDINI, O. D. et al. Chagas disease in Argentina. "National registry of chagas disease of the 'Federacion Argentina de Cardiologia'". RENECH study. **Revista De La Federacion Argentina De Cardiologia**, v. 45, n. 2, p. 84-92, Apr-Jun 2016.

MOREIRA, J. et al. Epidemiology of acute febrile illness in Latin America. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 24, n. 8, p. 827-835, Aug 2018.

MORET, A. L. et al. Serodiagnosis of Chagas's disease. Utility of an enzyme immunoassay with recombinant antigen on samples with inconclusive results. **Acta Bioquimica Clinica Latinoamericana**, v. 37, n. 2, p. 153-156, Jun 2003.

MOYA, A. A. Identification of characteristic time constants in the initial dynamic response of electric double layer capacitors from high-frequency electrochemical impedance. **Journal of Power Sources**, v. 397, p. 124-133, Sep 2018.

MS. **Boletim Epidemiológico. Doença de Chagas aguda no Brasil: série histórica de 2000 a 2013**. Secretaria de Vigilância em Saúde 46: 1-9 p. 2015.



MURCIA, L. et al. Success of benznidazole chemotherapy in chronic *Trypanosoma cruzi*-infected patients with a sustained negative PCR result. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 35, n. 11, p. 1819-1827, Nov 2016.

NAGASSE SUGAHARA, T. K. et al. Improvement of the slide hemagglutination test for rapid Chagas' disease screening in epidemiological surveys. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 29, n. 5, p. 623-628, May 1996.

NAJAFI, M. et al. A study of Electrocatalytic Activity of Ytterbium Tungstate Nanoparticles for the Determination of Nitrotriazolone. **Analytical & Bioanalytical Electrochemistry**, v. 11, n. 1, p. 80-89, Jan 2019.

NASCIMENTO, M. S. et al. Vimentin and Anti Vimentin Antibodies in Chagas' Disease. **Arquivos Brasileiros De Cardiologia**, v. 110, n. 4, p. 348-353, Apr 2018.

NAVARRETE-SANDOVAL, R. H.; SERVIN-ROJAS, M. Bug Smash, Bug Splash: A Case Report of an Unusual Transmission of American Trypanosomiasis with a Brief Review of the Literature. **American Journal of Case Reports**, v. 17, p. 993-996, Dec 2016.

NAYAK, M. et al. Detection of microorganisms using biosensors-A smarter way towards detection techniques. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 25, n. 4, p. 661-667, Dec 2009.

NEGRETTE, O. S. et al. Diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection in Primary Public Health Centers of Salta, Argentina. **Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana**, v. 47, n. 4, p. 701-707, Dec 2013.

NETO, V. A. Prevenção referente às modalidades alternativas de transmissão do *Trypanosoma cruzi*, no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 3, 2012.


NETO, V. A. et al. Prevenção referente às modalidades alternativas de transmissão do *Trypanosoma cruzi*. **Revista de Medicina**, v. 79, n. 1, p. 12-26, 2000.

NIBORSKI, L. L. et al. Serological based monitoring of a cohort of patients with chronic Chagas disease treated with benznidazole in a highly endemic area of northern Argentina. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 6, p. 365-371, Jun 2016.

NICOLETTI, M. A.; DA SILVA, E. L. CONTROLE E TRATAMENTO DAS DOENÇAS NEGLIGENCIADAS: VISÃO DA SITUAÇÃO ATUAL. **Revista Saúde-UNG-Ser**, v. 7, n. 3-4, p. 65-81, 2014.

NIKOLIC, M. V. et al. Investigation of ZnFe₂O₄ spinel ferrite nanocrystalline screen-printed thick films for application in humidity sensing. **International Journal of Applied Ceramic Technology**, v. 16, n. 3, p. 981-993, May-Jun 2019.

ODEWUNMI, N. A.; KAWDE, A. N.; IBRAHIM, M. In-situ single-step electrochemical AgO modified graphite pencil electrode for trace determination of DL-methionine in human serum sample. **Sensors and Actuators B-Chemical**, v. 281, p. 765-773, Feb 2019.



OLIVEIRA, B. G. et al. Health-related quality of life in patients with Chagas disease. **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical**, v. 44, n. 2, p. 150-156, Mar-Apr 2011.

OZCAN, A.; SAHIN, Y. A novel approach for the determination of paracetamol based on the reduction of N-acetyl-p-benzoquinoneimine formed on the electrochemically treated pencil graphite electrode. **Analytica Chimica Acta**, v. 685, n. 1, p. 9-14, Jan 2011.

PACHECO, W. F. et al. Voltammetry: A brief review about concepts. v. 5, n. 4, p. 516-537, 2013.

PANAMEÑO PINEDA, J.; LUQUETTI, A.; CASTRO, C. J. R. D. S. B. D. M. T. Comparison between the classical and artificial xenodiagnosis in chronic Chagas' disease. v. 31, n. 5, p. 473-480, 1998.

PANE, S. et al. Serological evaluation for Chagas disease in migrants from Latin American countries resident in Rome, Italy. **Bmc Infectious Diseases**, v. 18, p. 7, May 2018.

PAREDES, J. L. et al. The Effects of Ingesting a High-fat Diet on Wistar Rats Chronically Infected with *Trypanosoma cruzi*. **Kasmera**, v. 37, n. 1, p. 74-89, Jan-Jun 2009.

PARICIO-TALAYERO, J. M. et al. Epidemiological surveillance of vertically-transmitted Chagas disease at three maternity hospitals in the Valencian Community. **Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica**, v. 26, n. 10, p. 609-613, Dec 2008.

PELJO, P.; SMIRNOV, E.; GIRAULT, H. H. Heterogeneous versus homogeneous electron transfer reactions at liquid-liquid interfaces: The wrong question? **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 779, p. 187-198, Oct 2016.

PELLEGRINI, D.; JORDAN, R.; BRUETMAN, J. E. Chagas' Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 19, p. 1881-1882, Nov 2015.

PEREIRA, S. V. et al. A microfluidic device based on a screen-printed carbon electrode with electrodeposited gold nanoparticles for the detection of IgG anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies. **Analyst**, v. 136, n. 22, p. 4745-4751, 2011.

PEREYRA, N. B. et al. Estimation of the sensitivity and specificity of two *Mycoplasma suis* diagnostic tests in Argentina using a Bayesian model. **Archivos De Medicina Veterinaria**, v. 43, n. 2, p. 117-125, 2011.

PEREZ-AYALA, A. et al. Usefulness of the ARCHITECT Chagas (R) assay as a single test for the diagnosis of chronic Chagas disease. **Tropical Medicine & International Health**, v. 23, n. 6, p. 634-640, Jun 2018.

PERUSKI, A. H.; PERUSKI, L. F. Immunological methods for detection and identification of infectious disease and biological warfare agents. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 10, n. 4, p. 506-513, Jul 2003.



PICKA, M. C. M. et al. Definition of a diagnostic routine in individuals with inconclusive serology for chagas disease. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 11, n. 2, p. 226-233, Apr 2007.

PINAZO, M. J. et al. Characterization of Digestive Involvement in Patients with Chronic *T. cruzi* Infection in Barcelona, Spain. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 8, p. 7, Aug 2014.

PINTO, A. Y. D. et al. Acute phase of Chagas disease in the Brazilian Amazon region. Study of 233 cases from Para, Amapa and Maranhao observed between 1988 and 2005. **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical**, v. 41, n. 6, p. 602-614, Nov-Dec 2008.

PINTO, A. Y. D. N. et al. Fase aguda da doença de Chagas na Amazônia brasileira. Estudo de 233 casos do Pará, Amapá e Maranhão observados entre 1988 e 2005. 2008.

PINTO, B. F. et al. CD86 Expression by Monocytes Influence an Immunomodulatory Profile in Asymptomatic Patients with Chronic Chagas Disease. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 13, Mar 2018.

PINTO, F. S. et al. Epidemiological profile of *Trypanosoma cruzi*-infected mothers and live birth conditions in the state of Minas Gerais, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 2, p. 196-199, 2013.

PIZARRO-CARMONA, V. et al. An Optimized Impedance Model for the Estimation of the State-of-Charge of a Li-Ion Cell: The Case of a LiFePO₄ (ANR26650). **Energies**, v. 12, n. 4, p. 16, Feb 2019.

POLO, J. L.; CANO, E.; BASTIDAS, J. M. An impedance study on the influence of molybdenum in stainless steel pitting corrosion. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 537, n. 1-2, p. 183-187, Nov 2002.

PORTELA-LINDOSO, A. A. B.; SHIKANAI-YASUDA, M. A. J. R. D. S. P. Chronic Chagas' disease: from xenodiagnosis and hemoculture to polymerase chain reaction. v. 37, n. 1, p. 107-115, 2003.

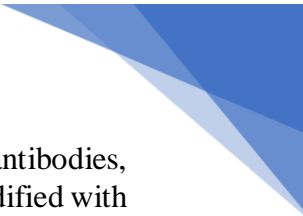
PORTELA-LINDOSO, A. A. B.; SHIKANAI-YASUDA, M. A. J. R. D. S. P. Doença de Chagas crônica: do xenodiagnóstico e hemocultura à reação em cadeia da polimerase. v. 37, p. 107-115, 2003.

PY, M. Neurologic Manifestations of Chagas Disease. **Current Neurology and Neuroscience Reports**, v. 11, n. 6, p. 536-542, Dec 2011.

RAMIREZ, J. D. et al. Evaluation of the analytical and diagnostic performance of a digital droplet polymerase chain reaction (ddPCR) assay to detect *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 12, p. 17, Dec 2018.

RASSI A JR, R. A., MARIN-NETO JA. . **Lancet**, v. 375, n. 4, p. 1388-402., 2010.

RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. In: (Ed.). **Neglected Tropical Diseases-Latin America and the Caribbean**: Springer, 2015. p.45-71.



REGIART, M. et al. An electrochemical immunosensor for anti-T-cruzi IgM antibodies, a biomarker for congenital Chagas disease, using a screen-printed electrode modified with gold nanoparticles and functionalized with shed acute phase antigen. **Microchimica Acta**, v. 183, n. 3, p. 1203-1210, Mar 2016.

REICHE, E. M. V. et al. Doença de Chagas congênita: epidemiologia, diagnóstico laboratorial, prognóstico e tratamento. **Jornal de Pediatria**, v. 72, n. 3, p. 125-132, 1996.

REN, T. et al. Enhancing the high-voltage performances of Ni-rich cathode materials by homogeneous La₂O₃ coating via a freeze-drying assisted method. **Ceramics International**, v. 44, n. 12, p. 14660-14666, Aug 2018.

REY, L. Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África. In: (Ed.). **Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África**, 2001.

RIBONE, M. E. et al. Amperometric bioelectrode for specific human immunoglobulin G determination: Optimization of the method to diagnose American trypanosomiasis. **Analytical Biochemistry**, v. 350, n. 1, p. 61-70, Mar 2006.

RIGANTI, J. et al. Reactivation of Chagas' disease: cutaneous manifestations in two immunosuppressed patients. **International Journal of Dermatology**, v. 51, n. 7, p. 829-834, Jul 2012.

RÍOS, J. F. et al. Probable brote de transmisión oral de enfermedad de Chagas en Turbo, Antioquia. **Biomédica**

v. 31, n. 2, 2011.

ROCHA-GASO, M. I. et al. Biosensors to Diagnose Chagas Disease: A Brief Review. **Sensors**, v. 17, n. 11, p. 12, Nov 2017.


RODRIGUES-DOS-SANTOS, I. et al. Exploring the parasite load and molecular diversity of *Trypanosoma cruzi* in patients with chronic Chagas disease from different regions of Brazil. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 11, p. 19, Nov 2018.

ROJO-MEDINA, J. et al. Chagas disease in Mexico. **Gaceta Medica De Mexico**, v. 154, n. 5, p. 605-612, Sep-Oct 2018.

ROSAS F VD, C. M. Enfermedad de Chagas. **Sociedad Colombiana de Cardiología y Cirugía Cardiovascular**, v. 18, n. 5, p. 241-244, 2011.

ROSS, A.; NOVOAMONTERO, D. Comparability and reliability of elisa, immunofluorescence, and indirect hemagglutination assays for *Trypanosoma-cruzi* and *Trypanosoma-rangeli*. **Journal of Infectious Diseases**, v. 168, n. 6, p. 1581-1584, Dec 1993.

ROTO, R.; VILLEMURE, G. Electrochemical impedance spectroscopy of electrodes modified with thin films of Mg-Mn-CO₃ layered double hydroxides. **Electrochimica Acta**, v. 51, n. 12, p. 2539-2546, Feb 2006.



SA, A. R. N. et al. Limit of detection of PCR/RFLP analysis of cytochrome oxidase II for the identification of genetic groups of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in biological material from vertebrate hosts. **Parasitology Research**, v. 117, n. 8, p. 2403-2410, Aug 2018.

SAEZ-ALQUEZAR, A. Estudo multicentrico: avaliação do desempenho de conjuntos diagnosticos de hemaglutinação indireta, disponiveis no brasil, para o diagnostico sorologico da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. **Revista de Patologia Tropical**, v. 26, n. 2, 1997.

SAEZ-ALQUEZAR, A. J. R. D. P. T. J. O. T. P. ESTUDO MULTICENTRIO: AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DE CONJUNTOS DIAGNOSTICOS DE HEMAGLUTINAÇÃO INDIRETA, DISPONIVEIS NO BRASIL, PARA O DIAGNOSTICO SOROLOGICO DA INFECÇÃO PELO *Trypanosoma cruzi*. v. 26, n. 2, 1997.

SALINAS, E. et al. Continuous-flow/stopped-flow system for enzyme immunoassay using a rotating bioreactor: determination of Chagas disease. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 21, n. 2, p. 313-321, Aug 2005.

SALUD, O. P. D. L. **Estimación cuantitativa de la enfermedad de Chagas en las Américas**: Organización Panamericana de la Salud Montevideo, Uruguay 2006.

SANCHEZ-CAMARGO, C. L. et al. Comparative Evaluation of 11 Commercialized Rapid Diagnostic Tests for Detecting *Trypanosoma cruzi* Antibodies in Serum Banks in Areas of Endemicity and Nonendemicity. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 7, p. 2506-2512, Jul 2014.

SANGENIS, L. H. C. et al. Transmissão da doença de Chagas por consumo de carne de caça: revisão sistemática. **Revista Brasileira de Epidemiologia** v. 19, p. 803-811, 2016.


SANITÁRIA., A. N. D. V. Resolução da Diretoria Colegiada nº 57, 16 de dezembro de 2010. <<http://www.prosangue.sp.gov.br/uploads/legislacao>>. (Acesso em 09 de maio de 2019). 2010. Disponível em: <<<http://www.prosangue.sp.gov.br/uploads/legislacao>>>. Acesso em: 09 de maio de 2019.

SANTOS, A. M. et al. Baroreflex Sensitivity and its Association with Arrhythmic Events in Chagas Disease. **Arquivos Brasileiros De Cardiologia**, v. 102, n. 6, p. 579-586, Jun 2014.

SANTOS, C. S. et al. Electrochemical Immunosensor for Qualitative Diagnosis of the American Trypanosomiasis Based on Gold Modified with 3-Mercaptopropionic. **Journal of the Electrochemical Society**, v. 163, n. 5, p. B158-B162, 2016.

SANTOS, F. L. N. et al. Performance Assessment of Four Chimeric *Trypanosoma cruzi* Antigens Based on Antigen-Antibody Detection for Diagnosis of Chronic Chagas Disease. **Plos One**, v. 11, n. 8, p. 15, Aug 2016.

SANTOS, K. K. A. et al. Trypanocide, cytotoxic, and antifungal activities of *Momordica charantia*. **Pharmaceutical Biology**, v. 50, n. 2, p. 162-166, Feb 2012.



SANTOS, V. R. C. D. et al. Acute Chagas disease in the state of Pará, Amazon Region: is it increasing?, v. 113, n. 5, 2018.

SAÚDE., O. O. P. A. D. Doença de Chagas: guia para vigilância, prevenção, controle e manejo clínico da Doença de Chagas transmitida por alimentos. In: OPAS, R. D. J. (Ed.), 2009. cap. 1,

SCHATTSCHEIDER, W. et al. A comparative-study of 4 serological methods for diagnosis of acute and chronic Chagas-disease in brazilian patients. **Tropical and Geographical Medicine**, v. 44, n. 3, p. 210-218, Jul 1992.

SCHIJMAN, A. G. et al. Early diagnosis of recurrence of Trypanosoma cruzi infection by polymerase chain reaction after heart transplantation of a chronic Chagas' heart disease patient. v. 19, n. 11, p. 1114-1117, 2000.

SCHMUNIS, G. Trypanosoma cruzi, the etiologic agent of Chagas' disease: status in the blood supply in endemic and nonendemic countries. **Transfusion**, v. 31, n. 6, p. 547-557, 1991.

_____. Tripanossomíase americana: seu impacto nas Américas e perspectivas de eliminação. **Clínica e Terapêutica da Doença de Chagas. Um Manual Prático para o Clínico Geral**, p. 11-24, 1997.

SCHMUNIS, G. A.; YADON, Z. E. Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problem. **Acta Tropica**, v. 115, n. 1-2, p. 14-21, Jul-Aug 2010.

SCHMUNIS, G. J. T. Trypanosoma cruzi, the etiologic agent of Chagas' disease: status in the blood supply in endemic and nonendemic countries. **Transfusion**

v. 31, n. 6, p. 547-557, 1991.

SCHOLZ, F. J. J. O. S. S. E. Wilhelm Ostwald's role in the genesis and evolution of the Nernst equation. v. 21, n. 7, p. 1847-1859, 2017.

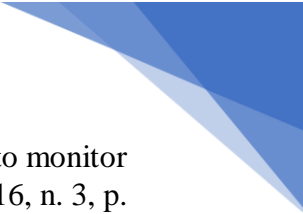
SGUASSERO, Y. et al. Course of serological tests in treated subjects with chronic Trypanosoma cruzi infection: A systematic review and meta-analysis of individual participant data. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 73, p. 93-101, Aug 2018.

SHAN, B. B. et al. Novel SERS labels: Rational design, functional integration and biomedical applications. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 371, p. 11-37, Sep 2018.

SHAO, F. Y. et al. Ternary Pt-Co-Cu nanodendrites for ultrasensitive voltammetric determination of insulin at very low working potential. **Microchimica Acta**, v. 184, n. 7, p. 2031-2038, Jul 2017.

SHIN, D. M. et al. Exploring the use of impedance spectroscopy in relaxation and electrochemical studies. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 53, n. 2-4, p. 157-176, 2018.

SIGOLAEVA, L. V. et al. Surface Functionalization by Stimuli-Sensitive Microgels for Effective Enzyme Uptake and Rational Design of Biosensor Setups. **Polymers**, v. 10, n. 7, p. 18, Jul 2018.



SILVA, E. D. et al. Use of the EIE-Recombinant-Chagas-Biomanguinhos kit to monitor cure of human Chagas' disease. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 16, n. 3, p. 132-136, 2002.

SILVA, I. G. D.; LUQUETTI, A. O.; SILVA, H. H. G. D. J. R. D. S. B. D. M. T. Importância do método de obtenção das dejeções dos triatomíneos na avaliação da suscetibilidade triatomínica para *Trypanosoma cruzi*. v. 26, n. 1, p. 19-24, 1993.

SINGHA, S. S. et al. Au nanoparticles functionalized 3D-MoS₂ nanoflower: An efficient SERS matrix for biomolecule sensing. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 119, p. 10-17, Nov 2018.

SOBRAL FILHO, D. C. J. A. B. D. C. An Approach to The Acute Phase of Chagas' Disease: The Continuing Challenge it Presents in the 21 (st) Century. v. 112, n. 3, p. 247-248, 2019.

SOPCIC, S.; SESELJ, N.; ROKOVIC, M. K. Influence of supporting electrolyte on the pseudocapacitive properties of MnO₂/carbon nanotubes. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 23, n. 1, p. 205-214, Jan 2019.

STANAWAY, J. D.; ROTH, G. The Burden of Chagas Disease Estimates and Challenges. **Global Heart**, v. 10, n. 3, p. 139-144, Sep 2015.

STATS, D. Cold hemagglutination and cold hemolysis - the hemolysis produced by shaking cold agglutinated erythrocytes. **Journal of Clinical Investigation**, v. 24, n. 1, p. 33-42, 1945.

STEPHEN, D. S.; ABRAHAM, A. High-fat simple carbohydrate (HFSC) diet impairs hypothalamic and corpus striatal serotonergic metabolic pathway in metabolic syndrome (MetS) induced C57BL/6J mice. **Nutritional Neuroscience**, v. 22, n. 1, p. 51-62, Jan 2019.


STEVENS, J. F.; REVEL, J. S.; MAIER, C. S. Mitochondria-Centric Review of Polyphenol Bioactivity in Cancer Models. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 29, n. 16, p. 1589-1611, Dec 2018.

STILLWAGGON, E. et al. Congenital Chagas Disease in the United States: Cost Savings through Maternal Screening. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, n. 6, p. 1733-1742, 2018.

SULEKAR, S. S. et al. Effect of a DC bias on the conductivity of gadolinia doped ceria thin films. **Electrochimica Acta**, v. 303, p. 275-283, Apr 2019.

SUN, K. et al. Recombinase polymerase amplification combined with a lateral flow dipstick for rapid and visual detection of *Schistosoma japonicum*. **Parasites & Vectors**, v. 9, p. 9, Aug 2016.

SUN, Y. et al. Optimization methodology for structural multiparameter surface plasmon resonance sensors in different modulation modes based on particle swarm optimization. **Optics Communications**, v. 431, p. 142-150, Jan 2019.



TAMAYO, J. A.; MELENDEZ, A. M.; CALDERON, J. A. An integrated approach to evaluating the effect of associated minerals on copper ammoniacal thiosulfate leaching of a gold-bearing sulfide concentrate. **Hydrometallurgy**, v. 184, p. 9-21, Mar 2019.

TAPIA-GARAY, V. et al. Assessing the risk zones of Chagas' disease in Chile, in a world marked by global climatic change. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 1, p. 24-29, Jan 2018.

TARAHOMI, S.; ROUNAGHI, G. H.; DANESHVAR, L. A novel disposable sensor based on gold digital versatile disc chip modified with graphene oxide decorated with Ag nanoparticles/beta-cyclodextrin for voltammetric measurement of naproxen. **Sensors and Actuators B-Chemical**, v. 286, p. 445-450, May 2019.

TEIXEIRA-CARVALHO, A. et al. FC-TRIPLEX Chagas/Leish IgG1: A Multiplexed Flow Cytometry Method for Differential Serological Diagnosis of Chagas Disease and Leishmaniasis. **Plos One**, v. 10, n. 4, p. 15, Apr 2015.

THACKER, J. D.; CASALE, E. S.; TUCKER, C. M. Immunoassays (ELISA) for rapid, quantitative analysis in the food-processing industry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 9, p. 2680-2685, Sep 1996.

THIRUMALRAJ, B. et al. A reliable electrochemical sensor for determination of H₂O₂ in biological samples using platinum nanoparticles supported graphite/gelatin hydrogel. **Microchemical Journal**, v. 146, p. 673-678, May 2019.

THOMPSON, M. et al. Electrochemical biosensors in the assay of antibiotics. **Analytica Chimica Acta**, v. 104, n. 2, p. 195-203, 1979.

TIWARI, A. et al. Household expenditure on leprosy outpatient services in the Indian health system: A comparative study. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 1, p. 13, Jan 2018.


TRABELSI, H. et al. Oxygen-vacancy-related giant permittivity and ethanol sensing response in SrTiO₃-delta ceramics. **Physica E-Low-Dimensional Systems & Nanostructures**, v. 108, p. 317-325, Apr 2019.

TRUCCOLO, A. B. et al. Association between endothelial function and autonomic modulation in patients with chagas disease. v. 100, n. 2, p. 135-140, 2013.

TRUTA, L.; SALES, M. G. F. Carcinoembryonic antigen imprinting by electropolymerization on a common conductive glass support and its determination in serum samples. **Sensors and Actuators B-Chemical**, v. 287, p. 53-63, May 2019.

TSAI, H. et al. Feasibility Study of Biosensors Based on Polymelamine-modified Screen-printed Carbon Electrodes. **Electroanalysis**, v. 29, n. 9, p. 2053-2061, Sep 2017.

TSAI, J. Z. et al. Screen-printed carbon electrode-based electrochemical immunosensor for rapid detection of microalbuminuria. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 77, p. 1175-1182, Mar 2016.



TUFA, L. T. et al. Electrochemical immunosensor using nanotriplex of graphene quantum dots, Fe₃O₄, and Ag nanoparticles for tuberculosis. **Electrochimica Acta**, v. 290, p. 369-377, Nov 2018.

TULLY, E.; HIGSON, S. P.; KENNEDY, R. O. The development of a 'labelless' immunosensor for the detection of *Listeria monocytogenes* cell surface protein, Internalin B. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 23, n. 6, p. 906-912, Jan 2008.

UMESHBABU, E.; JUSTIN, P.; RAO, G. R. Tuning the Surface Morphology and Pseudocapacitance of MnO₂ by a Facile Green Method Employing Organic Reducing Sugars. **Acs Applied Energy Materials**, v. 1, n. 8, p. 3654-3664, Aug 2018.

UMEZAWA, E. S. et al. Trypanosoma cruzi defined antigens in the serological evaluation of an outbreak of acute Chagas disease in Brazil (Catole do Rocha, Paraiba). **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 1, p. 87-93, Jan-Feb 1996.

VELASQUEZ-ORTIZ, N. et al. Trypanosoma cruzi infection, discrete typing units and feeding sources among Psammolestes arthuri (Reduviidae: Triatominae) collected in eastern Colombia. **Parasites & Vectors**, v. 12, p. 11, Apr 2019.

VIGILATO, M. A. N. et al. Progress towards eliminating canine rabies: policies and perspectives from Latin America and the Caribbean. **Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences**, v. 368, n. 1623, p. 8, Aug 2013.

VILLA, C. H. et al. Biocompatible coupling of therapeutic fusion proteins to human erythrocytes. **Blood Advances**, v. 2, n. 3, p. 165-176, Feb 2018.

VIZZONI, A. G. et al. Ageing with Chagas disease: an overview of an urban Brazilian cohort in Rio de Janeiro. **Parasites & Vectors**, v. 11, p. 8, Jun 2018.

WAGHMARE, M. A. et al. Effect of ZrO₂ barrier layers on the photovoltaic parameters of rose bengaldye-sensitized TiO₂ solar cell. **Journal of Materials Science-Materials in Electronics**, v. 30, n. 6, p. 6015-6022, Mar 2019.


WALECKX, E. et al. Non-randomized controlled trial of the long-term efficacy of an Ecohealth intervention against Chagas disease in Yucatan, Mexico. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 7, p. 15, Jul 2018.

WANG, J.; KAWDE, A. N. Pencil-based renewable biosensor for label-free electrochemical detection of DNA hybridization. **Analytica Chimica Acta**, v. 431, n. 2, p. 219-224, Mar 2001.

WANG, L. N. et al. One step synthesis of hierarchical Cu nanoparticles-Co(OH)₂ nanoflakes/Ni-foam electrode for ultrasensitive detection of glucose. **Applied Surface Science**, v. 467, p. 773-781, Feb 2019.

WESTBROEK, P.; PRINIOTAKIS, G.; KIEKENS, P. **Analytical electrochemistry in textiles**. Elsevier, 2005. ISBN 1845690877.

WOLLERT, W. Preparation of patients for biosensors. **Aerospace Medicine**, v. 37, n. 3, p. 309+, 1966.



WU, L. Y. et al. Degradation of bisphenol A by persulfate activation via oxygen vacancy-rich $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-x}$. **Chemosphere**, v. 221, p. 412-422, Apr 2019.

XU, Y.; WU, L.; ANG, L. K. MoS_2 -Based Highly Sensitive Near-Infrared Surface Plasmon Resonance Refractive Index Sensor. **Ieee Journal of Selected Topics in Quantum Electronics**, v. 25, n. 2, p. 7, Mar-Apr 2019.

YADAV, M. et al. Cobalt oxide nanocrystals anchored on graphene sheets for electrochemical determination of chloramphenicol. **Microchemical Journal**, v. 146, p. 881-887, May 2019.

YAMAN, Y. T.; AKBAL, O.; ABACI, S. Development of clay-protein based composite nanoparticles modified single-used sensor platform for electrochemical cytosensing application. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 132, p. 230-237, May 2019.

YAN, C. X. et al. Investigation of the Lithiation Mechanism of Fe_3O_4 -Based Composite Anode: the Effect of the Carbon Matrix. **Chemistryselect**, v. 1, n. 13, p. 3979-3991, Aug 2016.

YAN, M. et al. Electrogenerated Chemiluminescence from a Phenyleneethynylene Derivative and its Ultrasensitive Immunosensing Application Using a Nanotubular Mesoporous Pt-Ag Alloy for Signal Amplification. **Advanced Functional Materials**, v. 22, n. 18, p. 3899-3906, Sep 2012.

YANG, Z. et al. A surface plasmon resonance sensor based on concave-shaped photonic crystal fiber for low refractive index detection. **Optics Communications**, v. 430, p. 195-203, Jan 2019.

YILMAZ, N.; AYDIN, E. B.; SEZGINTURK, M. K. An epoxysilane modified indium tin oxide electrode for the determination of PAK 2: Application in human serum samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 1062, p. 68-77, Jul 2019.

YIN, H. Y.; WAN, Y.; WANG, L. Au/NiO/Multi-Walled Carbon Nanotubes Nanocomposite Electrode for Nitrite Electrochemical Determination. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 19, n. 8, p. 5279-5286, Aug 2019.

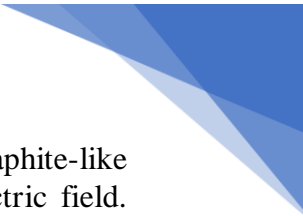
YOSHIDA, N. Molecular mechanisms of *Trypanosoma cruzi* infection by oral route. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 101-107, 2009.

YU, N. N. et al. Pulsed galvanostatic control of a solid-contact ion-selective electrode for potentiometric biosensing of microcystin-LR. **Sensors and Actuators B-Chemical**, v. 230, p. 785-790, Jul 2016.

ZAINUDDIN, A. A.; NORDIN, A. N.; AB RAHIM, R. Recent trends in dengue detection methods using biosensors. **Iium Engineering Journal**, v. 19, n. 2, p. 134-153, Dec 2018.

ZAUZA, P. **Avaliação dos níveis de anticorpos (IgG) anti-T. cruzi em soros de pacientes chagásicos crônicos de Virgem da Lapa, Minas Gerais, Brasil.** 2000. Tese de Mestrado, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ

ZHANG, C. M. et al. The Liquid Level Detection System Based on Pressure Sensor. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 19, n. 4, p. 2049-2053, Apr 2019.



ZHANG, D. F.; WANG, J. X. Visible-light-responsive bismuth oxybromide/graphite-like C₃N₄ hybrid material and its application in photocatalysis via internal electric field. **Journal of the Iranian Chemical Society**, v. 16, n. 4, p. 827-839, Apr 2019.

ZHANG, H. et al. Long-Range Surface Plasmon Resonance Sensor Based on Side-Polished Fiber for Biosensing Applications. **Ieee Journal of Selected Topics in Quantum Electronics**, v. 25, n. 2, p. 9, Mar-Apr 2019.

ZHANG, Y.; CHEN, Y. New insights into copper corrosion in presence of benzotriazole and chloride ions. **Corrosion Engineering Science and Technology**, v. 54, n. 1, p. 75-85, Jan 2019.

ZHAO, Y. Y. et al. Enhanced photocatalytic activity of Ag-CsPbBr₃/CN composite for broad spectrum photocatalytic degradation of cephalosporin antibiotics 7-ACA. **Applied Catalysis B-Environmental**, v. 247, p. 57-69, Jun 2019.

ZHOU, Q.; HE, C. L.; CAI, Q. K. Effect of Al₂O₃ Powders on Properties of Electrodeposited Ni Matrix. In: YIN, Y. S. e WANG, X. (Ed.). **Multi-Functional Materials and Structures II, Pts 1 and 2**. Durnten-Zurich: Trans Tech Publications Ltd, v.79-82, 2009. p.631-+. (Advanced Materials Research). ISBN 978-0-87849-304-3.

ZIADI, I. et al. Investigating the biocorrosion mechanism of 304L stainless steel in raw and treated urban wastewaters. **Engineering Failure Analysis**, v. 101, p. 342-356, Jul 2019.

ZOLLER, T.; PARISI, S.; STEGEMANN, M. Current aspects of Chagas disease and the German Chagas network ELCiD. **Flugmedizin Tropenmedizin Reisemedizin**, v. 26, n. 1, p. 25-30, Feb 2019.

ZOU, B. et al. Acetylcholinesterase biosensor based on functionalized surface of carbon nanotubes for monocrotophos detection. **Analytical Biochemistry**, v. 560, p. 12-18, Nov 2018.

ZREIN, M. et al. A novel antibody surrogate biomarker to monitor parasite persistence in Trypanosoma cruzi-infected patients. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 2, p. 16, Feb 2018.

ZUMA, A. A. et al. Chaetocin-A histone methyltransferase inhibitor-Impairs proliferation, arrests cell cycle and induces nucleolar disassembly in Trypanosoma cruzi. **Acta Tropica**, v. 170, p. 149-160, Jun 2017.

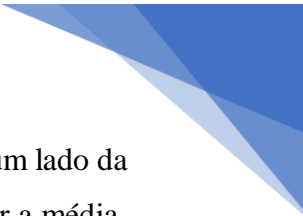
4. Seção Experimental

4.1. Materiais e Reagentes.

Cloreto de potássio PA (KCl, DINÂMICA), Ferrocianeto de potássio PA trihidratado ($K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$, VETEC), Fosfato de potássico monobásico PA (KH_2PO_4 , DINÂMICA), Fosfato de potássico dibásico anidro PA (K_2HPO_4 , DINÂMICA), Imuno-HAI CHAGAS (Kit de hemaglutinação indireta para detecção qualitativa e semiquantitativa de anticorpos anti-*T. Cruzi* em soro humano - WAMA Diagnóstica, São Carlos, SP), Kit de imunofluorescência indireta para o diagnóstico de infecção por *T. cruzi* (IFI) - CHAGAS, IgG (Bio-Manguinhos); kit de ensaio imunoenzimático para diagnóstico de infecção por *T. Cruzi* - Chagas, IgG (Bio-Manguinhos). Todas as outras soluções foram preparadas usando água purificada (resistividade aproximada, 18,2 M Ω cm). Todos os materiais eletroativos foram dissolvidos em solução tampão fosfato pH 7,0 (PBS) com 0,5 M KCl como eletrólito de suporte. Todos os experimentos foram realizados a temperatura de $22 \pm 2^\circ C$; Lápis de grafite HB (Faber-Castell) com um diâmetro de 2,0 mm e altura de 90 mm (composição: grafite e material cerâmico); cola de artesanato (MAKE +); câmara de Neubauer; lamínula; lixa 1200 (WETORDRY (3M)); determinador de umidade infravermelho (QIMIS); coletor estéril 50 mL (CRALPLAST); agitador de solução (Vortex) (AP56).

4.2. Contagem de Células Sensibilizadas por Antígenos de *T. Cruzi* em Câmara de Neubauer

Colocou-se a lamínula sobre a área demarcada na câmara de Neubauer de contagem. Usa-se lamínulas especiais que fornecem a profundidade correta da câmara de contagem. Homogeneizou-se a suspensão de células e transferiu-se 0,1 mL para um microtubo de ensaio de 2 mL. Adicionou-se 0,4 mL de corante azul de tripano 0,2% ao microtubo, obtendo assim uma diluição 1/4. Misturou-se os conteúdos e foi retirado uma alíquota de 0,5 mL com uma micropipeta. Encostou-se a ponta da pipeta na borda da lamínula, preencheu cuidadosamente a câmara de contagem. O líquido preencheu apenas um lado da câmara e não chegou aos canais de cada lado da área de contagem. Deixou-se as células sedimentarem por 2 min. Focalizou-se a área demarcada da câmara de contagem com a objetiva de menor aumento. Nas áreas 1, 2, 3 e 4, o volume com a



lamínula colocada corresponde a $0,1 \text{ mm}^3$. Contou-se as células nas 4 áreas de um lado da câmara de contagem, seguindo o esquema e dividiu-se o valor por 4 para obter a média. Como a suspensão foi inicialmente diluída a $1/4$, o número de células contadas foi igual à média multiplicada pelo fator de diluição. Para obter o número de células/mL (n_c), multiplicou-se o valor obtido por 10.000, para corrigir pois: $1 \text{ mL} = 1.000 \text{ mm}^3$.

Na câmara de Neubauer obtemos o número de celular por $0,1 \text{ mm}^3$, então devemos multiplicar por 10, portanto $10 \times 1.000 = 10.000$. Assim temos a **Equação 4.1**:

$$n_c = \frac{\text{número total de células}}{\text{número de quadrantes contados}} \times \text{fator de diluição} \times 10.000 \quad \text{Equação 4.1}$$

4.3. Preparação do Biossensor com Hemácias de Aves Sensibilizadas com Antígenos *T. Cruzi*.

Parte do grafite foi isolado 40 mm com a cola do artesanato (composição: acetato de vinila e metanol), o tempo de secagem foi 5 min, antes da aplicação da cola, a superfície do grafite para aplicação da cola foi limpa com papel toalha.

A superfície superior do grafite de 2,0 mm de diâmetro foi lixada, com lixa 1200, logo após, foi acoplada a célula eletroquímica, e foi adicionado 2,5 μL de hemácias sensibilizadas à superfície do grafite 2,0 mm, as hemácias foram desumidificadas utilizando um determinador de umidade infravermelho sem balança por 5 min a uma temperatura de 25°C .

4.4. Morfologia da superfície do eletrodo de trabalho

Todas as superfícies foram secas por 24 h- no determinador de umidade por infravermelho a 25°C . A morfologia da superfície dos eletrodos de grafite (GE) com componentes eritrocitários sensibilizados por antígenos de *T. Cruzi* (GETC), GETC com soro controle negativo (GETCN) e GETC com soro controle positivo (GETCP), foram investigadas por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) (modelo FEI Quanta FEG 250, com uma tensão de aceleração de 1 e 30 kV: Ametek HX-1001 (detector de deriva de silício Apollo X (DDS)). Amostras foram afixadas em fita adesiva dupla face de carbono, aterradas com tinta adesiva condutora de prata, e foram revestidas com ouro (Au) em um metalizador modelo Quorum Q150R por 30 s, a 20 mA, e plasma gerado em atmosfera de argônio.

4.5. Medidas Eletroquímicas de Caracterização dos Eletrodos

CV e EIS foram realizados utilizando um potenciostato/galvanostato PGSTAT302N AUT84151 com um pacote de software NOVA 2.1.2 (Eco Chemie, Holanda). O sistema de três eletrodos (Figura 15) compreendeu um eletrodo de trabalho (GE, eletrodo de referência (Ag / AgCl; NaCl 3 M) e eletrodo auxiliar (placa de platina (1,0 cm x 2,0 cm)).

Figura 15. Três eletrodos utilizados no estudo: A) eletrodo de grafite, B) eletrodo de referência, C) eletrodo auxiliar e D) cela eletroquímica.




4.5.1. Construção da Cela Eletroquímica

A cela eletroquímica foi construída utilizando um recipiente de 3 cm de diâmetro na parte superior e inferior (plano ou rosqueado (0,3 mm no lado externo), com duas tampas de 0,05 mm de espessura (plano ou rosqueado (0,35 mm no interior) e inferior (plano ou rosqueado (0,35 mm no interior)), a tampa superior foram feitos dois orifícios para acoplar os eletrodos de referência e o contra eletrodo (0,4 mm e 0,5 mm de diâmetro, respectivamente) comunicando com o interior da cela. Na tampa inferior foi feito um orifício no centro com um diâmetro de 2,1 mm e 0,05 mm de espessura para o eletrodo de trabalho com um diâmetro de 2,0 mm. As distâncias entre os eletrodos foram iguais a 1 cm.

4.5.2. Medidas de VC e EIE

O eletrodo foi inserido na célula eletroquímica e os ensaios eletroquímicos foram realizados. VC, EIE foram utilizados para investigar o comportamento eletroquímico dos eletrodos em tampão PBS contendo solução 5,0 mM $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ (pH = 7,0). CV



foi registrado enquanto o potencial estava na faixa de -0,2 a 0,8 V com velocidade de varredura de 10 a 100 mVs⁻¹, para GE. GE, GETC, GETCN e GETCP também foram medidos por VC na velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹, o potencial empregado estava na faixa de -0,2 a 0,8 V.

O procedimento para EIE foi realizado com os seguintes parâmetros: potencial inicial de 0,22 V, amplitude de onda senoidal de 10 mV, a faixa de frequência investigada foi de 1 a 105 Hz. Estes parâmetros foram aplicados aos sistemas GE e GETC. O sistema GETC com diferentes volumes de soro controle negativo para doença de Chagas 1, 2,5, 5, 7,5, 10 e 15 µL, foi avaliado por EIE, com os parâmetros citados. Para cada volume utilizado, ao final de cada medida de EIE, o eletrodo foi limpo. Todos os procedimentos realizados com o sistema GETC com soro controle positivo para doença de Chagas foram semelhantes aos aplicados ao soro controle negativo.

4.6. Amostras Avaliadas por Testes Convencionais

Amostras de soros humanos para estudo foram obtidas de indivíduos de 22 a 75 anos, que realizam rotinas de coleta de sangue no Laboratório Central de Saúde Pública Dr. Costa Alvarenga - LACEN-PI. Todos os procedimentos adotados obedeceram ao estabelecido pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Estadual do Piauí – UESPI, que emitiu Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE): 84188418.8.0000.5209. O termo de consentimento livre e esclarecido foi obtido de todos os pacientes no estudo. Ao todo, foram obtidas 18 amostras, as quais foram especificadas como A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8, A9, A10, A11, A12, A13, A14, A15, A16, A17 e A18. Técnicas estabelecidas (convencionais) HAI, IFI e ensaio imunoenzimático para o diagnóstico da infecção por *T. Cruzi*. Todos os kits foram utilizados de acordo com as instruções do fabricante. As 18 amostras foram analisadas por análise estatística descritiva de frequência utilizando o programa SPSS 10.0.

4.7. Amostras Avaliadas por Cronopotenciometria

4.7.1. Preparo das Amostras Humanas para Análise por Cronopotenciometria

Cada amostra foi preparada para análise da seguinte forma: 10 µL da amostra de soro humano para 320 µL de solução tampão de fosfato a pH 7,0, sendo então agitadas (Vortex) por 30 s. Razão 1/32.

4.7.2. Parâmetros Utilizados para as Medidas de Cronopotenciometria

Os parâmetros aplicados para as medidas de cronopotenciometria foi corrente de 0 A, com tempo de duração de 500 s e intervalo de tempo de 0,01 s. Estes parâmetros foram aplicados para superfície do eletrodo (GE), superfície do eletrodo modificada por antígenos de *T. Cruzi* (GETC), superfície do eletrodo modificada por antígenos de *T. Cruzi* com amostra negativa (GETCN) e superfície do eletrodo modificada por antígenos de *T. Cruzi* com amostra positiva (GETCP).

4.7.3. Medidas de Cronopotenciometria

Cronopotenciometria foi utilizada para determinar a diferença entre as amostras de soros humano positivos para doença de Chagas das amostras soros humano negativos. O total de amostras analisadas foram 18. Cada amostra foi analisada em triplicata. Com os dados obtidos foram construídas curvas de potenciais em função do tempo para os três sistemas: GETC, GETCN e GETCP.

4.7.4. Análise de Agrupamento Hierárquico das Medidas de Cronopotenciometria dos Sistemas: GETC, GETCN e GETCP

Com os dados obtidos das 18 amostras. Foi verificado pela técnica de agrupamento de dendrogramas que fornece combinações de pares não ponderados baseados nos dados de variação de potencial obtidos por cronopotenciometria para os sistemas: GETC, GETCN e GETCP. A classificação do dendrograma, pelo programa

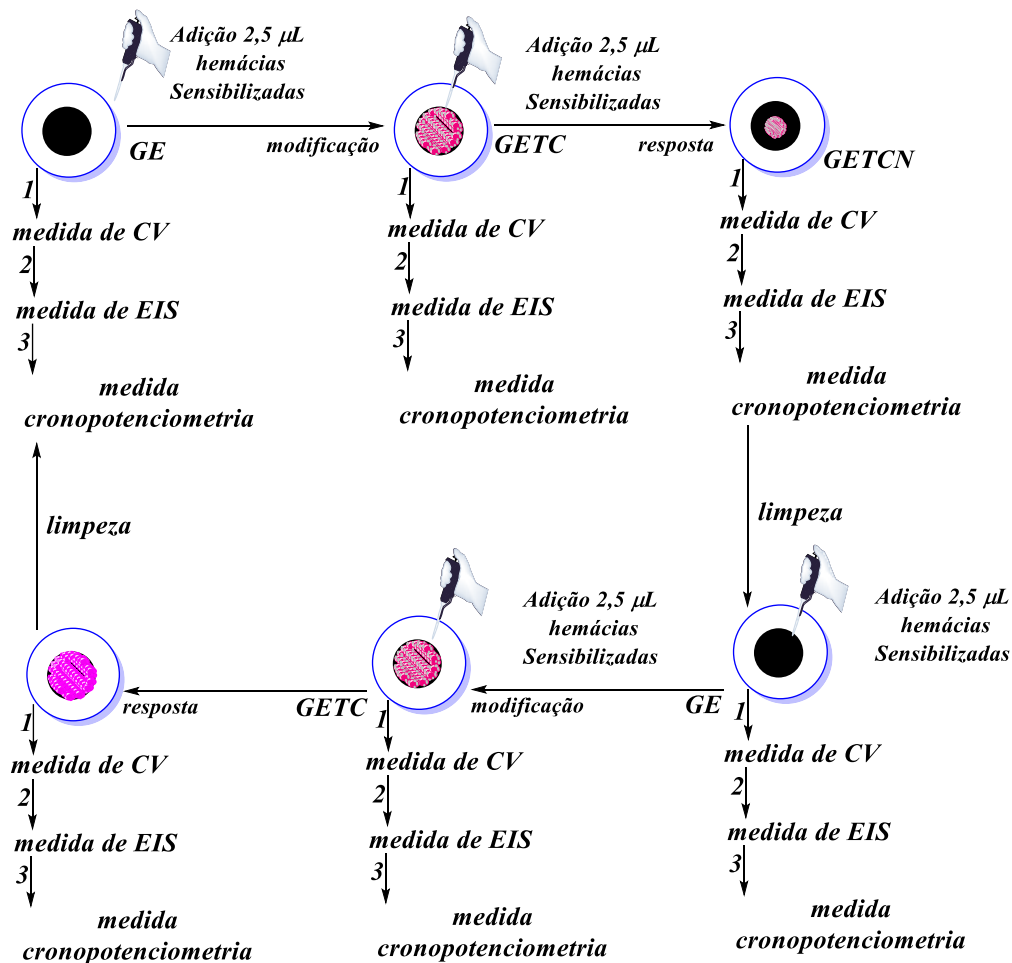
SPSS 10.0, foi realizada para verificar quais das amostras são mais semelhantes à superfície GETC.

4.8. Limpeza do eletrodo de trabalho

Antes de cada medida, a superfície foi submetida a VC na faixa de potencial de 0 a 1,5 V com as seguintes soluções: (1) volume de 5 mL de ácido clorídrico 0,1 mol L⁻¹ por 5 ciclos, (2) volume de 5 mL de ácido sulfúrico 0,5 mol L⁻¹ durante 5 ciclos, (3) o eletrodo foi ultrassônico com álcool isopropílico durante 10 minutos, depois lavado com água ultrapura, (4) a superfície foi lixada com lixa 1200. A limpeza dos eletrodos foi confirmada por VC, com velocidade de varredura de 100 mVs⁻¹ em solução tampão de fosfato (pH=7,0) durante 5 ciclos, na faixa de potencial -1,2 a 1,2 V.

Um resumo das medidas eletroquímicas realizadas está ilustrado esquematicamente na Figura 16.

Figura 16. Ilustração das modificações ocorridas na superfície do eletrodo de grafite

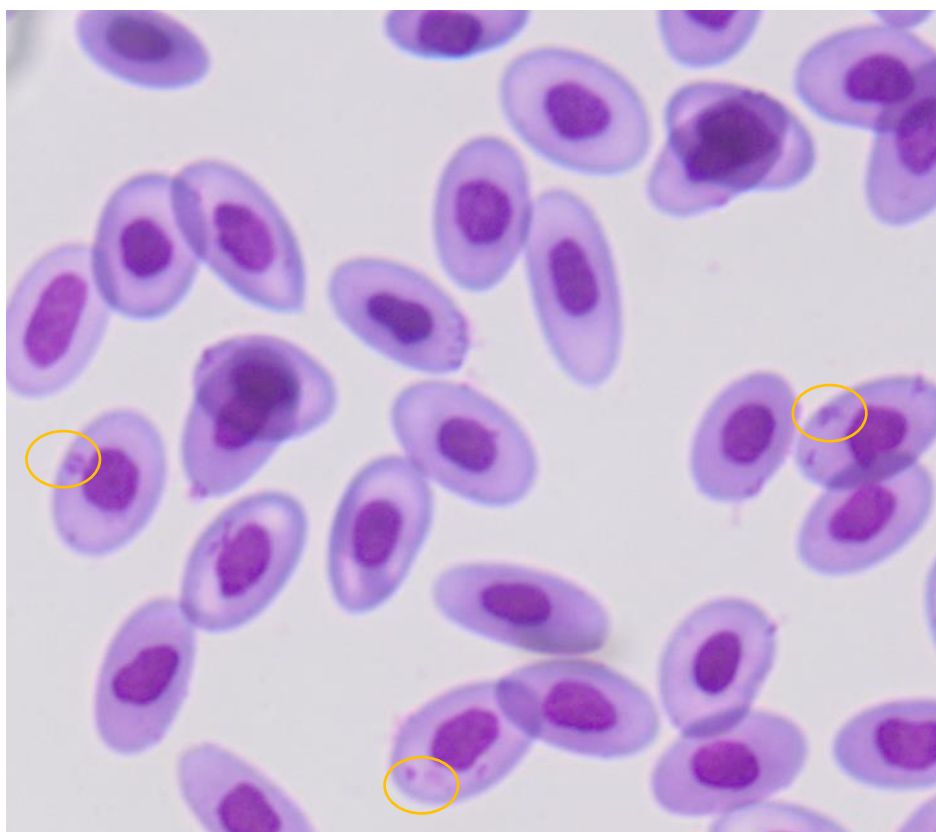


5. Resultados e Discussões

5.1. Contagem de Células Sensibilizadas por Antígenos de *T. Cruzi* em Câmara de Neubauer.

A contagem de células sensibilizadas por antígenos de *T. Cruzi* em Câmara de Neubauer revelou $1,1 \times 10^7$ células/mL. No estudo foi utilizado 2,5 μ L de suspensão de células aves que corresponde a $2,75 \times 10^4$ células. A Figura 17. mostra imagens das células sensibilizadas por antígenos de *T. Cruzi* em lamínulas visualizada e fotografada em microscópio óptico. As imagens mostram eritrócitos ovais com dimensões variadas e rugosidade em partes na superfície das células a elipse de borda laranja aponta os rusgo. Gallo et al. (GALLO *et al.*, 2015) mostraram que eritrócitos maduros de emas, corados pelo procedimento Panótico Rápido, têm tamanho variável e formato elíptico.

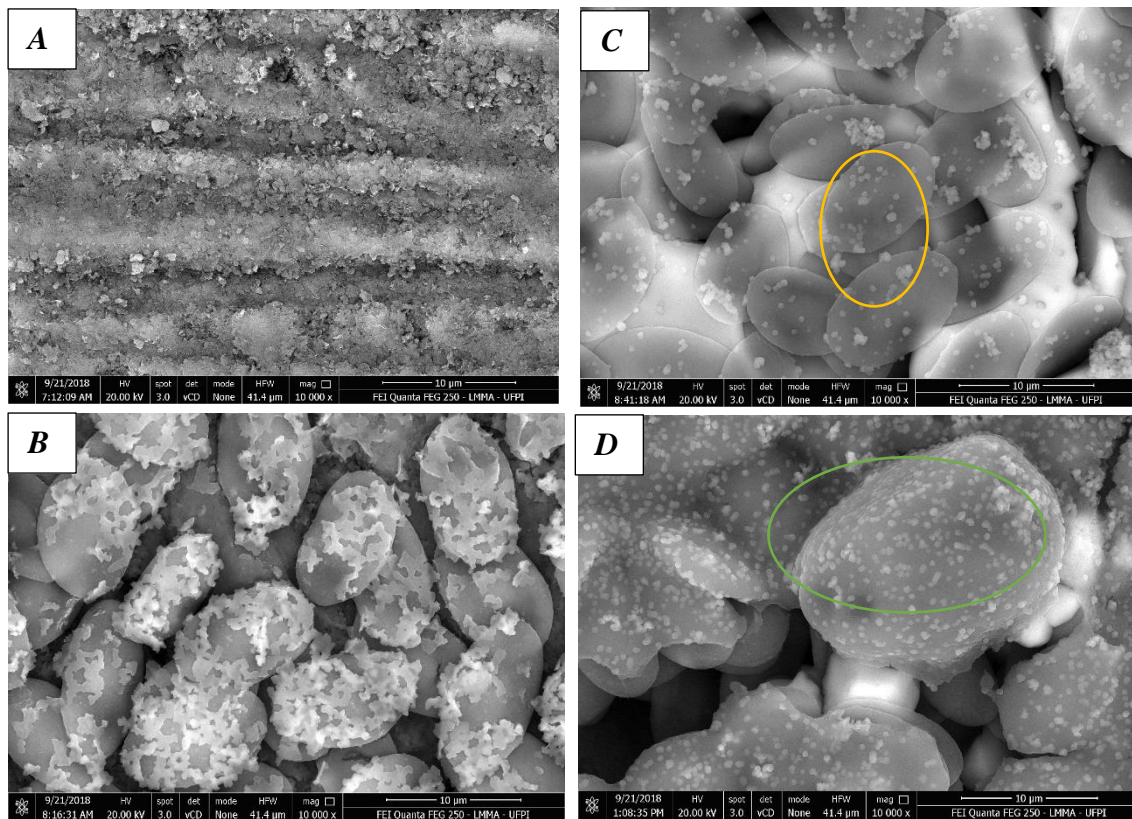
Figura 17. Imagens das células sensibilizadas por antígenos de *T. Cruzi* em lamínulas fotografada em microscópio óptico que mostra rugosidade (elipses com borda em laranja) na superfície das células que pode ser relacionada a sensibilização das células por antígenos de *T. Cruzi*.



5.2. Caracterização Morfológica e Constitutiva da Superfície dos Eletrodos: GE, GETC, GETCN e GETCP.

A morfologia da superfície dos eletrodos GE, GETC, GETCN e GETCP foi caracterizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), e as micrografias são mostradas na Figura 18. A Figura 18A mostra que a superfície GE é irregular e granular (não uniforme), que também foi exposto anteriormente por diferentes pesquisadores (AOKI *et al.*, 1989; CONGUR *et al.*, 2014; KASHYAP *et al.*, 2014). A Figura 18B (sistema GETC) mostra que as hemácias de aves que foram sensibilizadas por antígenos de *T. Cruzi* podem ser claramente vistas na superfície do GE, a morfologia das hemácias continua ovais com dimensões variadas, assim como na Figura 17, sendo as hemácias distribuídas horizontalmente espaçadas na superfície do GE, ainda é possível visualizar filamentos (rugosidade) na superfície das hemácias. Leighton (LEIGHTON, 1985) utilizou MEV para mostrar que as membranas das hemácias de aves são regulares e lisas, exibindo uma geometria de discos elípticos biconvexos com configuração e tamanho uniformes. A Figura 18C (sistema GETCN) mostra a superfície do GE com hemácias sensibilizadas, aos quais foram adicionados soro controle negativo para a doença de Chagas, através da imagem foi possível visualizar a aglutinação (elipse laranja) das hemácias, diferente do que ocorreu na Figura 18B. A Figura 18D (sistema GETCP) mostra a superfície do GE com hemácias sensibilizadas, aos quais foram adicionados soro controle positivo para doença de Chagas, a imagem mostra um distanciamento das hemácias (elipse laranja), diferente do que ocorreu na Figura 18C (aglutinação). Mancini et al (MANCINI *et al.*, 2004) mostraram imagens escuras, que foram relacionadas à concentração proteica de aglomerações de antígenos da Influeza tipo A com anticorpos presentes no soro humano, este trabalho reforça os aspectos revelados na Figura 18D (elipse verde).

Figura 18. Micrografias eletrônicas de varredura de (A) GE, (B) GETC, (C) GETCN (elipse com borda laranja destaca a aglutinação) e (D) GETCP (elipse com borda verde destaca o complexo proteico antígeno-anticorpo).



5.3. Caracterização Eletroquímica dos Sistemas

A superfície GE foi modificada para melhorar a qualidade e o tipo de grupos funcionais, através do artifício de polimento mecânico (KAHLERT, 2008).

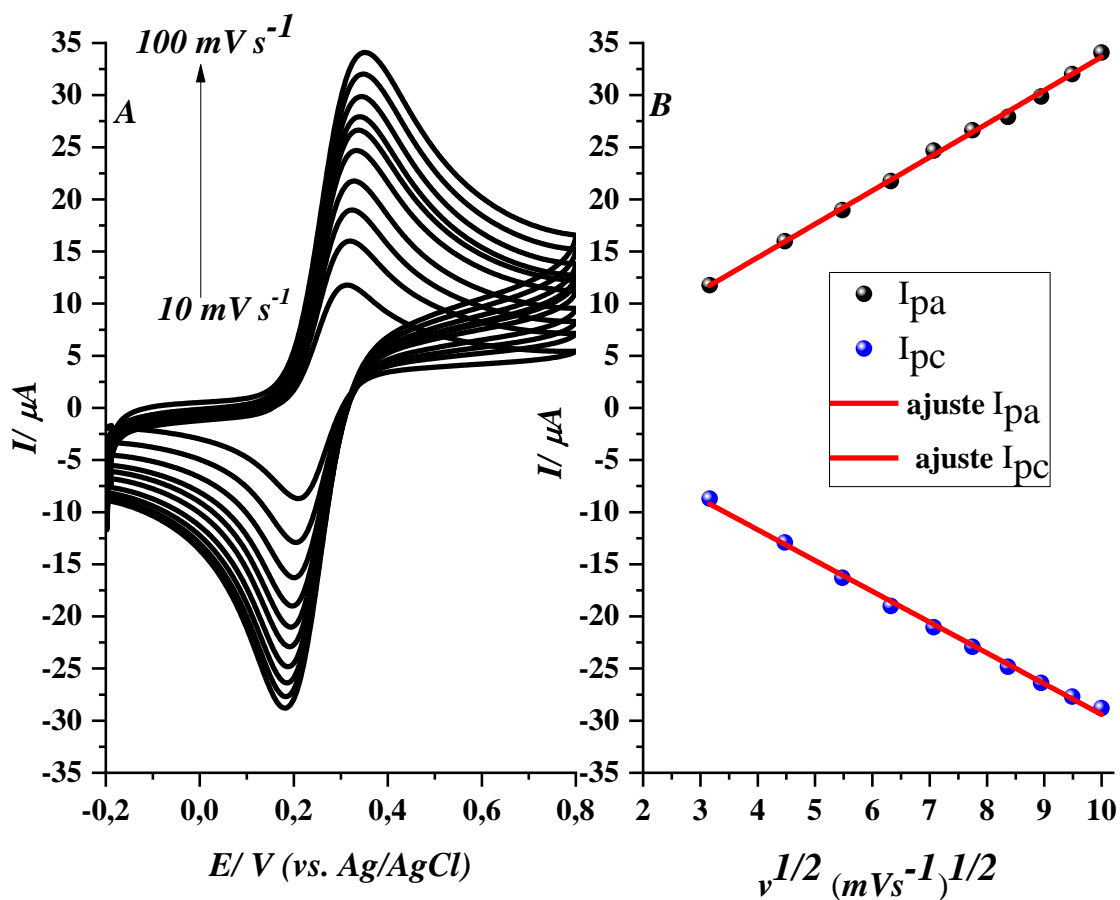
Para caracterizar a superfície do GE, posicionado no centro da parte inferior da célula eletroquímica, Figura 19, foi realizada a técnica de voltametria cíclica. A Figura 19A mostra voltamogramas cíclicos obtidos a partir da superfície GE em solução de PBS, na presença de solução de 5,0 mM $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ a diferentes velocidades de varredura 10 a 100 mVs^{-1} . Os picos anódico e catódico foram encontrados com a variação potencial de -0,2 V e 0,8 V. As correntes de pico foram obtidas a partir dos voltamogramas da Figura 19A. A Figura 19B mostra a variação das correntes de pico anódico e catódico em função da raiz quadrada da velocidade de varredura, que oferece uma relação linear entre essas duas variáveis. Isto mostra que é um sistema de Randles-Sevcik (BRETT e BRETT, 1996):

$$I_p = (2,686 \times 10^5) n^{3/2} A D_o^{1/2} v^{1/2} C_o$$

onde (I_p) é a corrente de pico (Ampere (A)), (n) é o número de elétrons envolvidos na reação redox (constante adimensional), (A) é área de eletrodo (cm^2), (D_o) é coeficiente de difusão ($cm^2 s^{-1}$), C_o é a concentração em massa da espécie ($mol cm^{-3}$) e v é a velocidade de varredura (Vs^{-1}).

Isto permitiu obter índices de correlação e coeficientes angulares. Assim, a equação linear do pico anódico (I_{pa}) é $y = 3,20727 \times 10^{-6} x + 1,58214 \times 10^{-6}$, ($R^2 = 0,9979$) e a equação linear de pico catódico (I_{pc}) é $y = -2,955665 \times 10^{-6} x + 0,13326 \times 10^{-6}$ ($R^2 = 0,9968$). A área geométrica GE utilizada neste estudo é de 0,03 cm^2 . A equação de Randles-Sevcik revela a área ativa da base do eletrodo de grafite (A), pela razão $I_p / v^{1/2}$, desde que n seja igual a 1, e C_o seja igual a 5 mM e D_o seja igual a $6.39 \times 10^{-6} cm^2 s^{-1}$ (ZOSKI, 2007). A partir do coeficiente angular da equação de corrente de pico anódica, a área ativa da base do eletrodo de grafite foi calculada em 0,0094 cm^2 , que corresponde aproximadamente a 3,2 vezes menos que sua área geometria.

Figura 19. (A) Voltamogramas cíclicos de $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ 5 mmol L⁻¹ em KCl 0,5 mol L⁻¹ (pH = 7,0) para GE. (B) parcelas de correntes de pico anódico e catódico vs raiz quadrada da velocidade de varredura.



A Figura 20 mostra os voltamogramas cíclicos dos eletrodos: GE, GETC, GETCN e GETCP. Os voltamogramas cíclicos com velocidade de 100 mVs⁻¹ mostram um pico de corrente anódica para a superfície do GE em 0,0034 A cm⁻² para o potencial de 0,35 V; a superfície do GE modificada com hemácias sensibilizadas (GETC), a corrente de pico anódica foi 0,0023 μA cm⁻² para o potencial de 0,34 V.

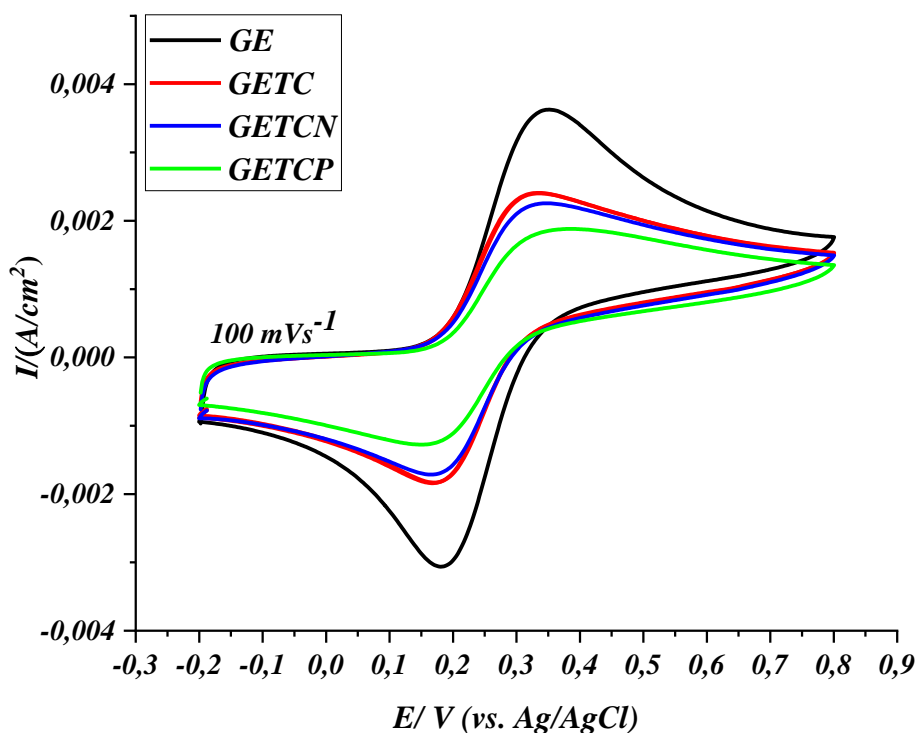
Para verificar a diminuição quantitativa de corrente, utilizou-se a diferença relativa percentual de corrente de pico anódica (% ΔIpa), expresso como na **Equação 5.1**

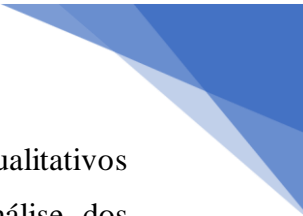
$$\% \Delta I_{pa} = |100 * [I_{pa}(GETCX) - I_{pa}(GETC)] / I_{pa}(GETC)| \quad \text{Equação 5.1}$$

onde: Ipa(GETCX) é a Ipa obtida com a interface GETCN ou GETCP; Ipa(GETC) é a Ipa obtida com a interface GETC.

Analisando a Figura 20, supõe-se que existe uma predominância do efeito resistivo sobre o efeito difusivo. Este efeito é devido a modificação que ocorre na superfície do GE, diminuindo a I_{pa} em 33,7% quando as hemácias sensibilizadas foram colocadas na superfície do GE (sistema GETC), como pode ser visto na Figura 18B. O passo seguinte foi colocar em contato com as hemácias sensibilizadas o controle negativo na superfície do GE (sistema GETCN), uma diminuição da I_{pa} ocorreu 0,44% em relação ao sistema GETC, a Figura 18C é o sistema analisado. Avaliando o sistema GETCP, que é o contato do controle positivo com as hemácias sensibilizadas na superfície do GE, uma diminuição I_{pa} ocorreu 16,8% em relação ao sistema GETC, a Figura 18D mostra o sistema GETCP. A diferença nesses voltamogramas pode estar relacionada a cada etapa de imobilização, uma vez que as moléculas bloquearam a transferência de elétrons (FIGUEIREDO *et al.*, 2015) entre a superfície do GE e o eletrólito.

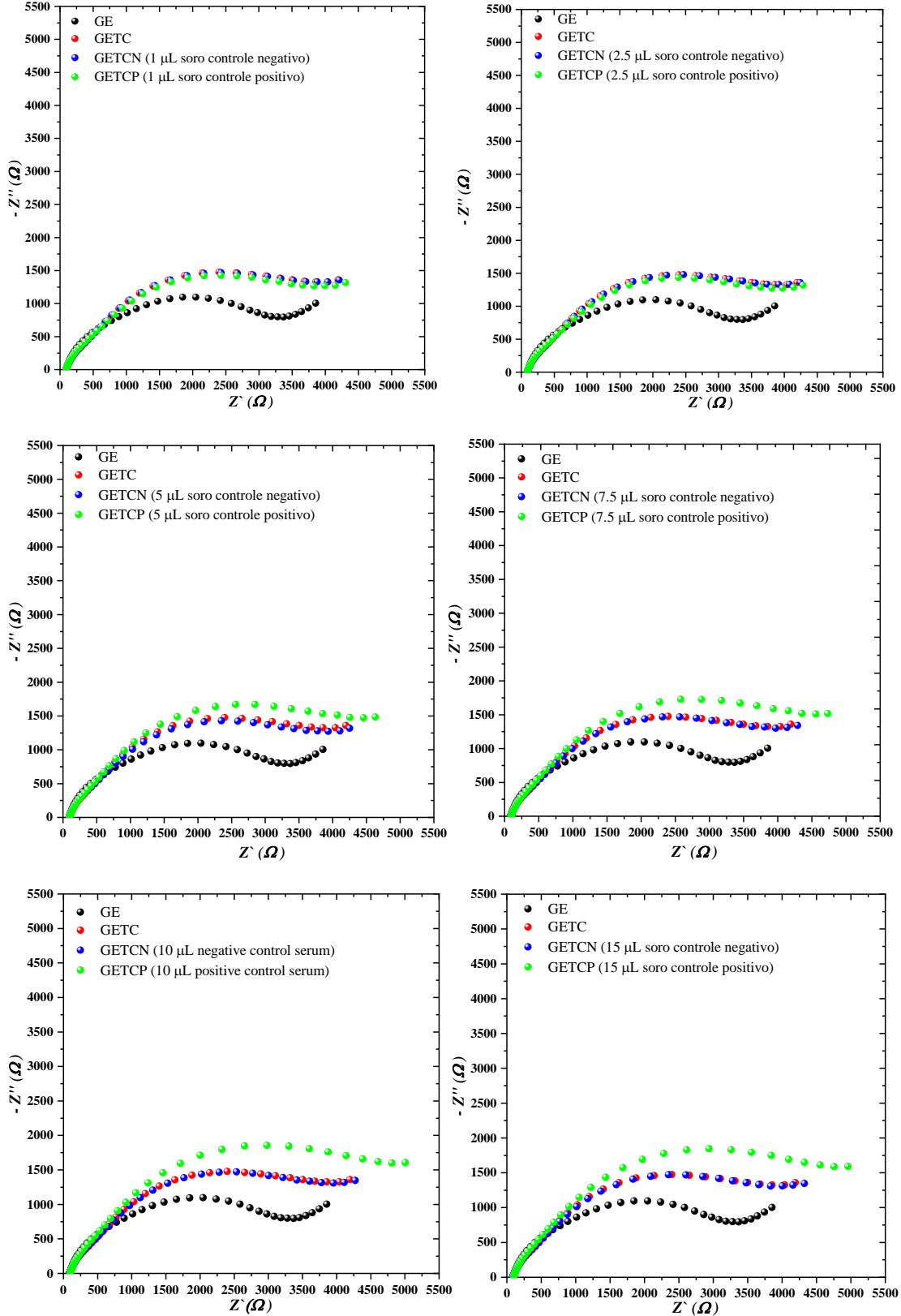
Figura 20. Voltamogramas cíclicos de $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ 5 mmol L^{-1} em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ($pH = 7,0$) para os sistemas GE, GETC, GETCN e GETCP, 100 mVs^{-1} .





A VC é a técnica mais frequentemente usada para contrair dados qualitativos sobre os métodos eletroquímicos (PACHECO *et al.*, 2013). Como a análise dos voltamogramas apontam para um efeito resistivo sobre o efeito difusivo para os sistemas analisados, a EIE foi escolhida para confirmar o efeito resistivo. A EIE é uma técnica sensível, eficiente e útil (GAYATHRI *et al.*, 2015; EL HASSANI *et al.*, 2017). Que foi utilizada para verificar as características de interferência eletrodo/eletrólito dos eletrodos modificados ou pré-tratados e o mecanismo de difusão entre eletrodo/solução (ATES, 2011). As propriedades da transferência de carga e difusão são elementos da configuração do espectro de impedância. O espectro forma um semicírculo e o diâmetro do semicírculo é a resistência de transferência de carga (R_{ct}), a região do semicírculo é caracterizada por processos de alta frequência e a difusão é uma região caracterizada por baixa frequência, sendo um extensão do espectro que forma uma inclinação de 45° em relação ao eixo Real (CHEN *et al.*, 2000). A Figura 21 ilustra os diagramas de Nyquist para as superfícies GE e GETC, bem como, para vários volumes de soro controle positivo ou soro controle negativo para doença de Chagas, soro associado ao sistema GETC, formando o sistema GETCN ou sistema GETCP, em solução 0,5M KCl contendo 5 mM $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ (pH=7.0). As medidas por EIS foram realizadas na faixa de frequência de 1 Hz a 10^5 Hz, com um potencial de 0,22 V, por que foi o potencial de meia onda obtido pela voltametria do sistema GE. Todos os sistemas GE, GETC, GETCN e GETCP apresentaram semicírculo acima 3000Ω . À medida que a superfície do eletrodo GE é modificada pelo complexo sensibilizado de hemácias ou hemácias sensibilizadas com soro controle negativo ou hemácias sensibilizadas com soro controle positivo, o semicírculo aumenta o diâmetro na ordem das estruturas complexas citadas.

Figura 21. Diagramas de Nyquist com um potencial de 0,22 V na presença de 5 mM $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3 \cdot 2O$ (pH=7.0) em solução 0,5M KCl para os GE, GETC, GETCN e GETCP. Amplitude = 10 mV. Faixa de frequência: 1 a 10^5 Hz. Variando o volume de controle positivo e negativo.



Dados de superfície, GE, GETC, GETCN e GETCP obtidos por impedância requerem circuito equivalente para uma avaliação quantitativa segura (DINIZ *et al.*, 2003). Figura 20 mostra o circuito proposto [Rs(C[R([RctW]Q)))] para as superfícies, este circuito foi aplicado em outros estudos (STELZLE *et al.*, 1993; OMANOVIC e ROSCOE, 2000; DINIZ *et al.*, 2003). O circuito de Randles modificado (Figura 18), diferente do que é comum (FOUQUET *et al.*, 2006; GURUSAMY *et al.*, 2018; KAUR *et al.*, 2019), foi usado para explicar o efeito de bloqueio das hemácias sensibilizadas à superfície do GE, ou hemácias sensibilizadas interagindo com o controle negativo, ou as hemácias sensibilizadas interagindo com o controle positivo, fica claro que os sistemas complexos na superfície do eletrodo GE bloquearam a transferência de elétrons entre a superfície do eletrodo e o eletrólito, que é tanto evidenciado na Figura 20 com diminuição nos picos de oxidação e redução, como também pelo aumento da resistência de troca de carga (aumento do semicírculo (impedância)) Figura 21. Com o ajuste e simulação, foi possível obter os valores da resistência de troca de carga dos diferentes sistemas GE, GETC, GETCN e GETCP. A Figura 22 ilustra a qualidade do ajuste, onde os resultados obtidos pela EIS (pontos) e os ajustes (linhas) são mostrados.

Os valores dos parâmetros de ajuste são mostrados na Tabela 5, onde um aumento no Rct pode ser visto para os sistemas GE, GETC, GETCN e GETCP. Quando a superfície é coberta por hemácias sensibilizadas, há um aumento na resistência de troca de carga devido ao bloqueio parcial da transferência de carga na dupla camada elétrica, como pode ser visto na Figura 18B, que indica a presença de hemácias sensibilizadas na superfície do eletrodo. Quando o sistema GETC entra em contato com o controle negativo, a porcentagem de mudança na Rct do sistema GETC é de apenas 2,27%, isso configura o complexo GETCN (Figura 18C). Quando o sistema GETC entra em contato com o controle positivo, a alteração percentual em Rct é de 25,17%, este sistema é expresso por GETCP (Figura 18D). O aumento observado na impedância do soro positivo é 11 vezes maior do que o observado com o soro negativo. Na forma quantitativa, o aumento foi medido em termos da diferença relativa percentual Rct (% ΔRct) e expresso como na **Equação 5.2**.

$$\% \Delta R_{ct} = 100 * [(R_{ct}(GETCX) - R_{ct}(GETC)) / R_{ct}(GETC)] \quad \text{Equação 5.2}$$

onde: Rct (GETCX) é a Rct obtida com a interface GETCN ou GETCP; Rct (GETC) é a Rct obtida com a interface GETC.

Figura 22. Diagrama de Nyquist obtido para eletrodos: GE, GETC, GETCN e GETCP. Controle positivo e controle negativo para volume de 10 μL . que caracterizam ou não a doença de Chagas. Onde parâmetros do circuito equivalente são: R_s é a resistência da solução; R e C são, respectivamente, a resistência e a capacitância associadas a uma camada na superfície do eletrodo; Q é a capacitância da dupla camada elétrica (elemento de fase constante); R_{ct} é a resistência de transferência de carga e W é a impedância de Warburg.

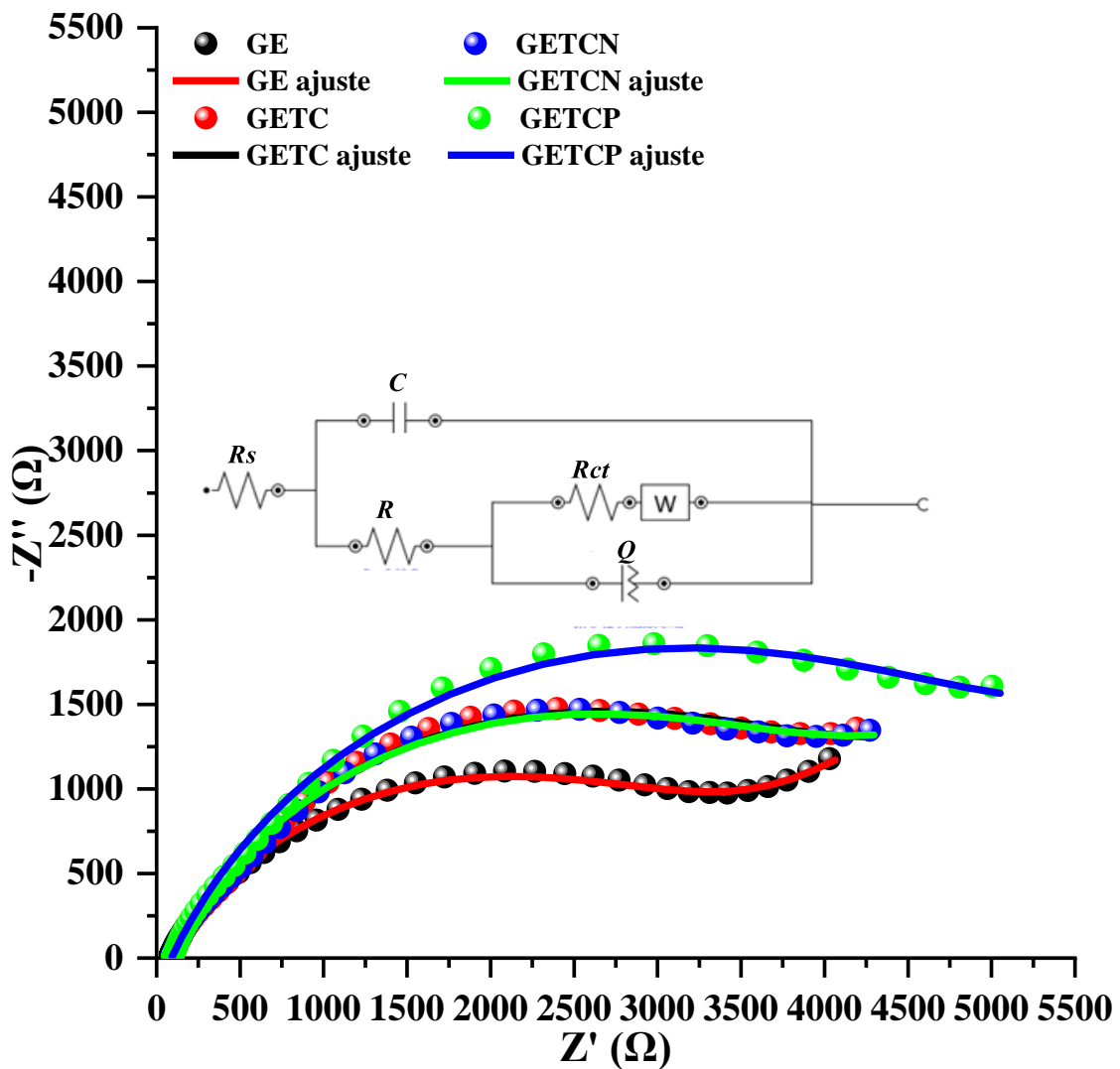


Tabela 5. Valores dos parâmetros de ajuste para o circuito equivalente para os sistemas GE, GETC, GETCN e GETCP.

	Rs (Ω)	R (Ω)	C (nF)	Rct (k Ω)	% Δ Rct
GE	72,00	7,37	60,34	3,55	
GETC	83,00	5,68	24,60	4,41	
GETCN	82,00	5,88	30,80	4,51	2,27
GETCP	86,50	5,97	4,83	5,52	25,17

Rs é a resistência da solução; R e C são, respectivamente, a resistência e a capacitância associadas a uma camada na superfície do eletrodo; Q é a capacitância de camada dupla (elemento de fase constante); Rct é a resistência de transferência de carga; W é a impedância de Warburg e % Δ Rct é diferença relativa percentual Rct l.

5.4. Resultados de Testes Diagnósticos (Convencionais) para Doença de Chagas vs Medidas de Cronopotenciometria.

Os resultados dos testes HAI, IFI e ensaio imunoenzimático para o diagnóstico da infecção por *T. Cruzi*, os dois últimos testes foram realizados pelo LACEN, que foram utilizados para os testes sorológicos das 18 amostras, estão especificados na Tabela 6. A análise estatística descritiva da frequência das 18 amostras mostrou que 44,4% (7) das amostras foram positiva para doença de Chagas, enquanto 56,6% (11) das amostras analisadas foram negativas para doença de Chagas, de acordo com testes convencionais aplicados. Os três testes utilizados corresponderam aos resultados positivos e negativos para a doença de Chagas.

A fim de verificar a relação com kits convencionais que caracterizam a doença de Chagas, a cronopotenciometria foi aplicada a um sistema GE modificado com hemácias sensibilizadas por antígenos de *T. Cruzi* interagindo com anticorpos *T. Cruzi* ou não. Alfonta, Singh e Willner (ALFONTA *et al.*, 2001) relataram lipossomas marcados com biotina e uma enzima peroxidase de rábano silvestre é utilizada como uma sonda para amplificar a detecção de antígeno-anticorpo ou oligonucleotídeo-DNA. O potencial transiente muda com a aplicação de um pulso cronopotenciométrica (mantendo 10 μ A por 10 s) na presença de 10 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. O eletrodo modificado por antígeno tem o maior potencial, após a adição de um anti-anticorpo, o potencial diminui.

Para obter uma melhor estabilidade do sistema e resposta temporal, a cronopotenciometria foi aplicada em 18 amostras de soros de pacientes do LACEN-PI. A Figura 23 mostra uma redução no potencial do sistema GETC quando amostras positivas

ou negativas são adicionadas, para diagnóstico da doença de Chagas, resultando em uma maior redução do potencial de amostras positivas, $\% \Delta(E_r)$ é a diferença de potencial resultante que caracterizará o indivíduo com ou sem doença de Chagas, esses dados estão na Tabela 6. O tempo necessário para reduzir foi estimado em 100 s. porque acredita-se que é o momento ideal para o equilíbrio dos sistemas estudados. A redução potencial foi medida em termos do valor dado em 100 s e expressa como na **Equação 5.3**.

$$\% \Delta(E_r) = 100 * [(E(\text{soro}) - E(\text{GETC})) / E(\text{GETC})] \quad \text{Equação 5.3.}$$

onde: E(soro) é o E obtido com a interface GETCN ou GETCP; e E (GETC) é o E obtido com a interface GETC.

Figura 23. Resposta dinâmica do GETC das 18 amostras que caracterizam ou não a doença de Chagas.

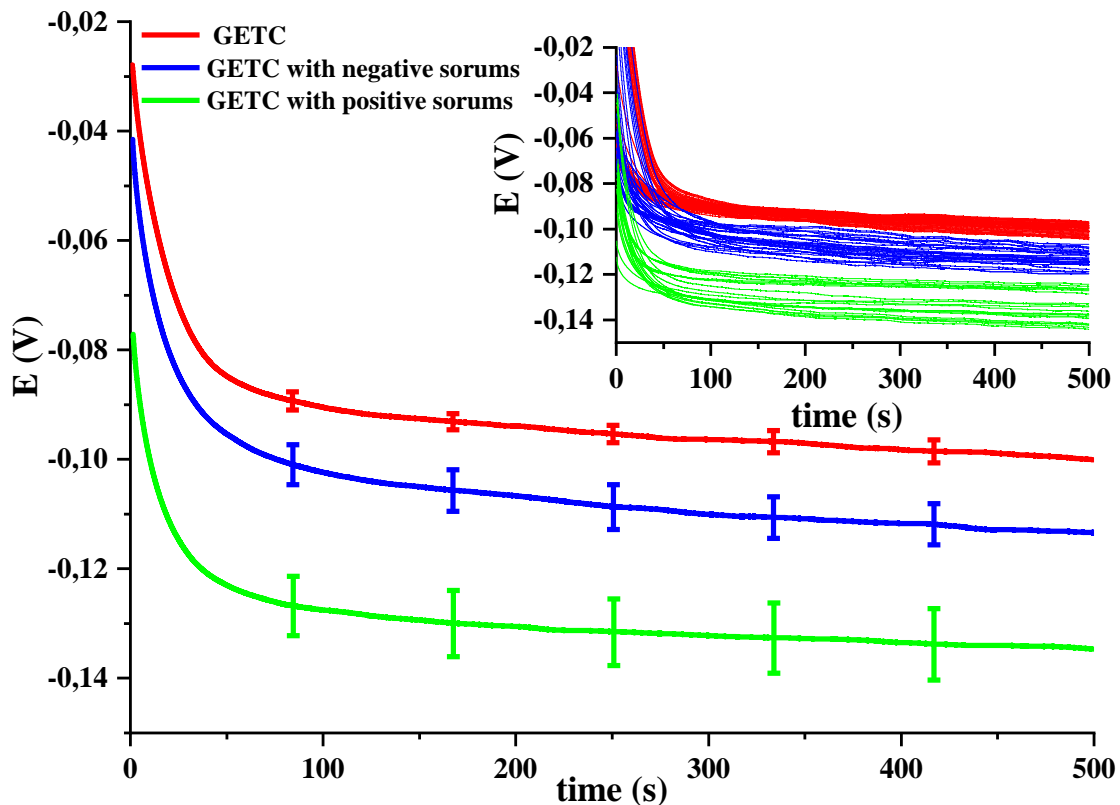


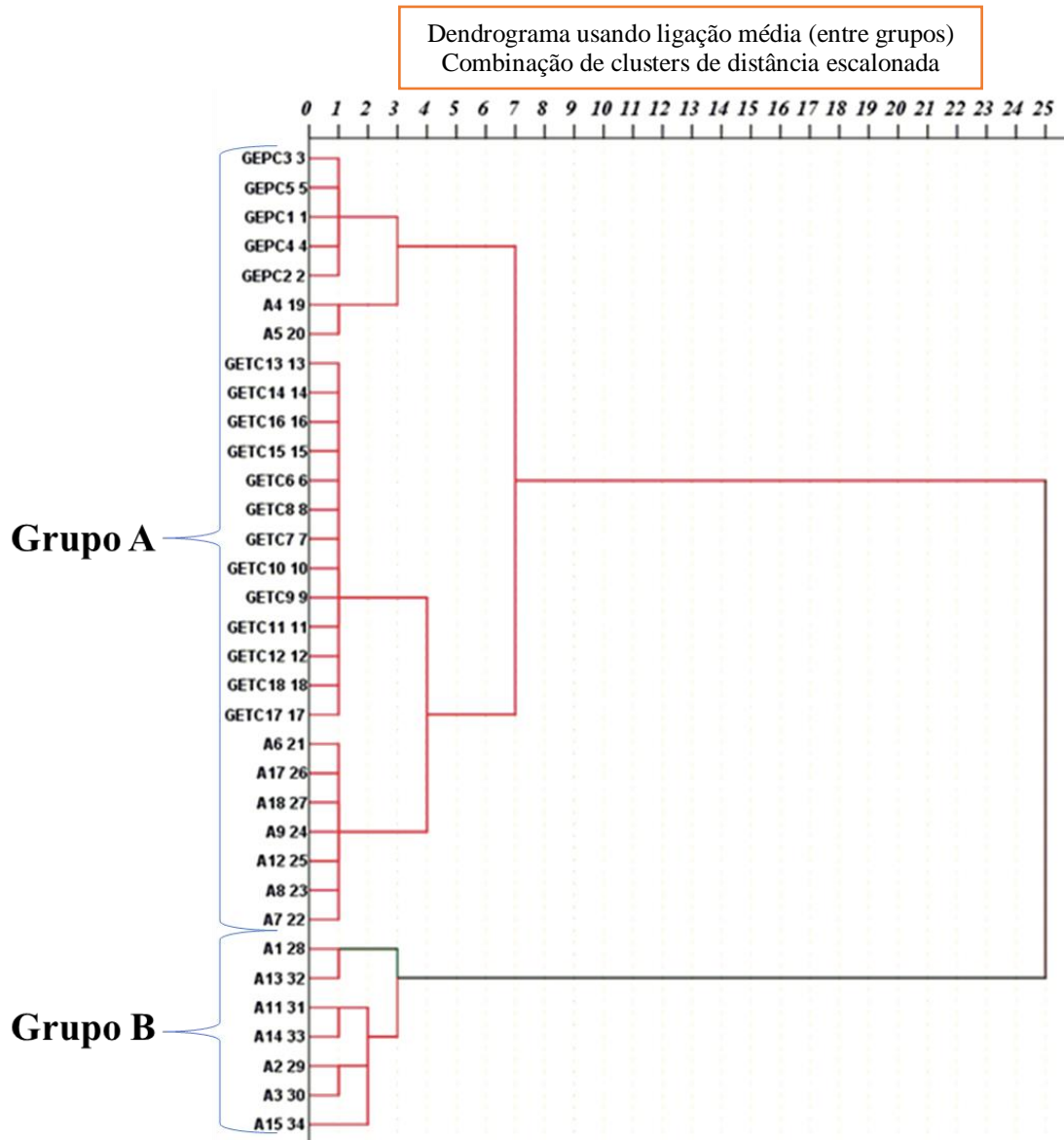
Tabela 6. Resultados dos testes sorológicos das 18 amostras com HAI, IFI, EI para diagnóstico da doença de Chagas e medidas de cronopotenciometria.

Amostras	HAI	IFI	Cut-off	EI	Cut-off	% Δ E
A4	Negativo	Não reativo	1/40	Negativo (0,109)	0,453	11,42
A5	Negativo	Não reativo	1/40	Negativo (0,069)	0,458	10,97
A6	Negativo	Não reativo	1/40	Negativo (0,065)	0,320	10,78
A7	Negativo	Não reativo	1/40	Negativo (0,153)	0,458	12,81
A8	Negativo	Não reativo	1/40	Negativo (0,126)	0,458	12,43
A9	Negativo	Não reativo	1/40	Negativo (0,186)	0,458	13,40
A10	Negativo	Não reativo	1/40	Negativo (0,119)	0,458	11,92
A12	Negativo	Não reativo	1/40	Negativo (0,055)	0,458	10,35
A16	Negativo	Não reativo	1/40	Negativo (0,437)	0,564	17,89
A17	Negativo	Não reativo	1/40	Negativo (0,109)	0,306	11,45
A18	Negativo	Não reativo	1/40	Negativo (0,163)	0,326	13,10
A1	Positivo	Positivo (1/80)	1/40	Positivo (2,373)	0,452	26,39
A2	Positivo	Positivo (1/80)	1/40	Positivo (2,436)	0,316	30,83
A3	Positivo	Positivo (1/80)	1/40	Positivo (4,520)	0,304	35,92
A11	Positivo	Positivo (1/160)	1/40	Positivo (4,057)	0,310	32,96
A13	Positivo	Positivo (1/160)	1/40	Positivo (2,791)	0,437	30,95
A14	Positivo	Positivo (1/80)	1/40	Positivo (8,146)	0,553	42,68
A15	Positivo	Positivo (1/320)	1/40	Positivo (9,738)	0,302	47,68

A Figura 24 mostra o dendrograma de medidas de potencial de circuito aberto para 18 amostras de soro. A análise de agrupamento de dendrogramas forma combinações de pares não ponderados dos potenciais de circuito aberto das amostras. Os resultados apresentados na Figura 24 servem para mostrar a relação entre a superfície do GE modificado por hemácias sensibilizadas com amostras negativas para doença de Chagas e com amostras positivas para doença de Chagas. A distância de até 7 das medidas de potencial de circuito aberto é semelhante para medidas da superfície do eletrodo modificado e com as medidas do eletrodo modificado em contato com soros negativos. Enquanto as distâncias acima de 7, ou precisamente 25, das medidas do potencial de circuito aberto mostram uma baixa relação entre as medidas dos potenciais de superfície do eletrodo modificado com as medidas dos potenciais de superfície do eletrodo modificado em contato com o soro positivo.

Assim, o dendrograma pode ser dividido em dois grupos: grupo A formado pelas medidas dos potenciais para eletrodo modificado e para as medidas dos potenciais do eletrodo modificado em contato com soro negativo, e o grupo B formado pelas medidas de potenciais por cronopotenciometria para eletrodo modificado em contato com soro positivo.

Figura 24. Dendrograma da variação de potencial em um tempo de 500 s para os sistemas: GETC, GETGN e GETCP.

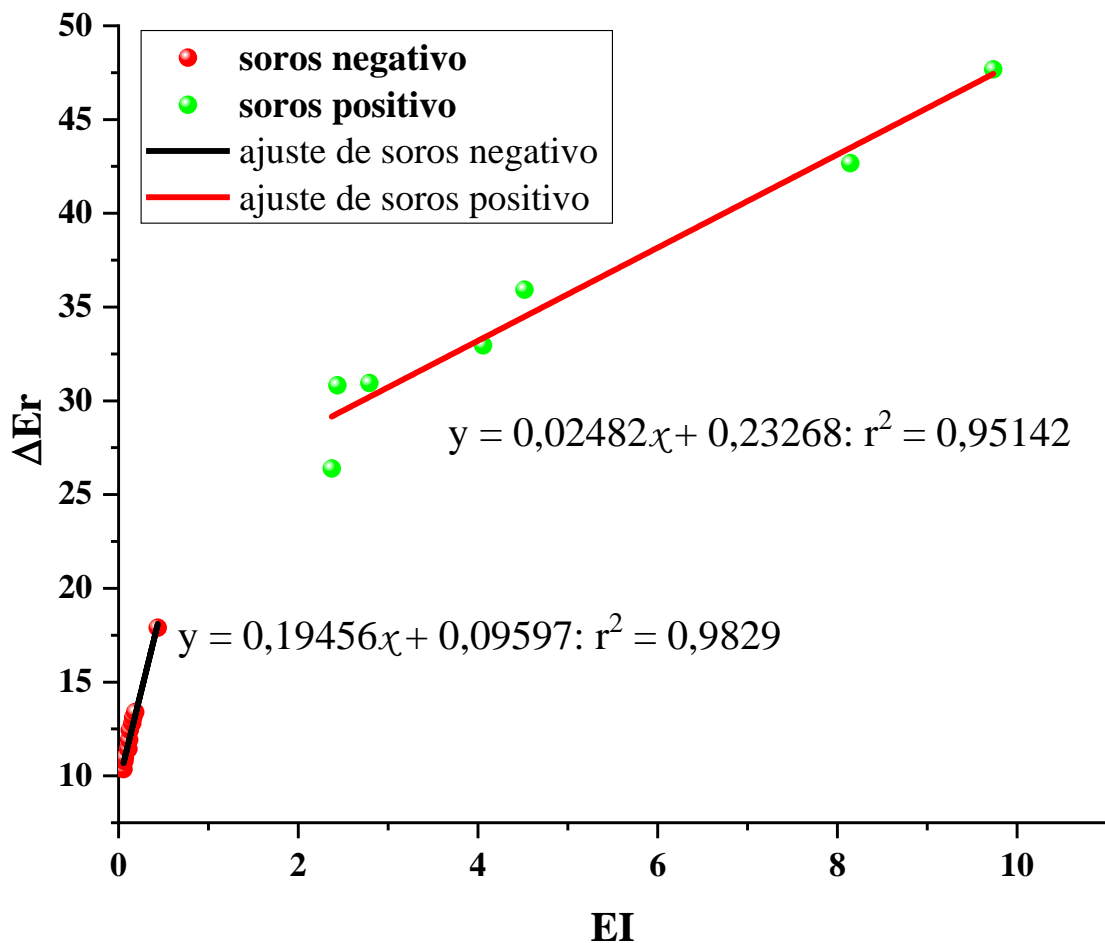


Três métodos comerciais: HAI, IFI e ensaio imunoenzimático para o diagnóstico da infecção por *T. Cruzi* foram usados para validar a proposta. Foram utilizadas 18 amostras e 11 foram confirmadas como negativas e 7 positivas para a doença de Chagas (Tabela 6). A Figura 25 mostra curvas de correlação dos resultados obtidos por cronopotenciometria em comparação com as medidas obtidas com ensaio imunoenzimático para o diagnóstico da infecção por *T. Cruzi*. Para as 18 amostras analisadas por cronopotenciometria foi possível obter um ponto de corte “cut off” em 16,55%.

A fim de verificar a correlação de amostras negativas e positivas individualmente entre ensaio imunoenzimático para o diagnóstico da infecção por *T. Cruzi* vs cronopotenciometria. Os coeficientes obtidos foram 0,9829 e 0,95142, respectivamente. Estes resultados mostram que existe uma melhor correlação entre os métodos para as amostras negativas.

Assim, a eficácia de distinguir infecção por doença de Chagas pela nova plataforma é indicada. Belluso et al (BELLUZO *et al.*, 2011) ressaltaram que para a infecção por *T. Cruzi*, a presença de anticorpos específicos para o *T. Cruzi* detectados é mais importante que a quantificação, porque significa que já ocorreu a infecção pelo *T. Cruzi*.

Figura 25. Curva de correlação entre os resultados obtidos pela cronopotenciometria e os resultados com o kit ensaio imunoenzimático para o diagnóstico da infecção por *T. Cruzi*. Para amostras positivas (verde) e para amostras negativas (vermelho).



Referências

ALFONTA, L.; SINGH, A. K.; WILLNER, I. Liposomes labeled with biotin and horseradish peroxidase: A probe for the enhanced amplification of antigen-antibody or oligonucleotide-DNA sensing processes by the precipitation of an insoluble product on electrodes. **Analytical Chemistry**, v. 73, n. 1, p. 91-102, Jan 2001.

AOKI, K. et al. APPLICABILITY OF GRAPHITE REINFORCEMENT CARBON USED AS THE LEAD OF A MECHANICAL PENCIL TO VOLTAMMETRIC ELECTRODES. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 263, n. 2, p. 323-331, May 1989.

ATES, M. Review study of electrochemical impedance spectroscopy and equivalent electrical circuits of conducting polymers on carbon surfaces. **Progress in Organic Coatings**, v. 71, n. 1, p. 1-10, May 2011.

BELLUZO, M. S. et al. Favorably orienting recombinant proteins to develop amperometric biosensors to diagnose Chagas' disease. v. 408, n. 1, p. 86-94, 2011.

BRETT, A. M. C. F. O.; BRETT, C. M. A. **Electroquímica: princípios, métodos e aplicações**. Almedina Coimbra, 1996.

CHEN, Y. et al. EIS studies of a corrosion inhibitor behavior under multiphase flow conditions. **Corrosion Science**, v. 42, n. 6, p. 979-990, Jun 2000.

CONGUR, G. et al. Succinamic acid functionalized PAMAM dendrimer modified pencil graphite electrodes for voltammetric and impedimetric DNA analysis. **Sensors and Actuators B-Chemical**, v. 201, p. 59-64, Oct 2014.

DINIZ, F. B. et al. Impedimetric evaluation for diagnosis of Chagas' disease: antigen-antibody interactions on metallic electrodes. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 19, n. 2, p. 79-84, Nov 2003.


EL HASSANI, N. E. et al. Novel strategy for sulfapyridine detection using a fully integrated electrochemical Bio-MEMS: Application to honey analysis. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 93, p. 282-288, Jul 2017.

FIGUEIREDO, A. et al. Electrical detection of dengue biomarker using egg yolk immunoglobulin as the biological recognition element. **Scientific reports**, v. 5, p. 7865, 2015.

FOUQUET, N. et al. Model based PEM fuel cell state-of-health monitoring via ac impedance measurements. **Journal of Power Sources**, v. 159, n. 2, p. 905-913, Sep 2006.

GALLO, S. S. M. et al. Hematological, morphological and morphometric characteristics of blood cells from rhea, Rhea Americana (Struthioniformes: Rheidae): a standard for Brazilian birds. **Brazilian Journal of Biology**, v. 75, n. 4, p. 953-962, Nov 2015.

GAYATHRI, S. B. et al. DNA nanostructures based biosensor for the determination of aromatic compounds. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 72, p. 191-196, Oct 2015.



GURUSAMY, P. et al. Electrical Conductivity Based Quality Measurement of Diesel Exhaust Fluid. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 73, n. 11, p. 1128-1135, Nov 2018.

KAHLERT, H. Functionalized carbon electrodes for pH determination. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 12, n. 10, p. 1255-1266, Oct 2008.

KASHYAP, D. et al. Application of electrochemical impedance spectroscopy in bio-fuel cell characterization: A review. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 35, p. 20159-20170, Dec 2014.

KAUR, A. et al. Self-assembled monolayers of 3-Hydroxy-N-(5-mercapto-1,3, 4-thiadiazol-2-yl) benzamide (HMTB): A platform for Impedimetric sensing of Co(II). **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 833, p. 221-230, Jan 2019.

LEIGHTON, F. A. MORPHOLOGICAL LESIONS IN RED BLOOD-CELLS FROM HERRING-GULLS AND ATLANTIC PUFFINS INGESTING PRUDHOE BAY CRUDE-OIL. **Veterinary Pathology**, v. 22, n. 4, p. 393-402, 1985.

MANCINI, D. A. P. et al. Influenza in heterothermics. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. 3, p. 204-209, 2004.

OMANOVIC, S.; ROSCOE, S. G. Interfacial behavior of beta-lactoglobulin at a stainless steel surface: An electrochemical impedance spectroscopy study. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 227, n. 2, p. 452-460, Jul 2000.

PACHECO, W. F. et al. Voltametrias: Uma breve revisão sobre os conceitos. v. 5, n. 4, p. 516-537, 2013.

STELZLE, M.; WEISSMULLER, G.; SACKMANN, E. ON THE APPLICATION OF SUPPORTED BILAYERS AS RECEPTIVE LAYERS FOR BIOSENSORS WITH ELECTRICAL DETECTION. **Journal of Physical Chemistry**, v. 97, n. 12, p. 2974-2981, Mar 1993.

ZOSKI, C. G. J. L. C.-N. M., ED THOMSOM. **Handbook of electrochemistry**. Las Cruces-New Mexico, Ed Thomsom, 2007.

6. Conclusões

Como conclusão dessa tese, pode-se afirmar que uma cela eletroquímica simples com materiais de baixo custo, tendo como eletrodo de trabalho a grafite, para detecção rápida de anticorpos específicos contra hemácias sensibilizadas por antígenos de *T. Cruzi* foi construída com sucesso.

Os métodos eletroquímicos de Voltametria cíclica e Espectroscopia de Impedância eletroquímica mostram que cela eletroquímica com eletrodo de trabalho modificado com hemácias sensibilizadas foi eficiente em diferenciar soro controle negativo de soro controle positivo que caracterizam a doença de Chagas.

Os testes comerciais utilizados nessa tese, apresentaram uma resposta comum para doença de Chagas, tanto para amostras positivas, como também para amostras negativas.

A cela eletroquímica com eletrodo de grafite modificado com hemácias sensibilizadas por antígenos de *T. Cruzi*, utilizando-se da técnica de cronopotenciometria foi capaz de distinguir soro de amostras humanas com doença de Chagas de amostras humanas sem doença de Chagas.

O dendrograma mostrou que a superfície do eletrodo de trabalho de grafite quando modificada por hemácias sensibilizadas por antígenos de *T. Cruzi* é muito semelhante a superfície eletrodo de grafite modificada pelas hemácias sensibilizadas em contato com controle negativo. Sendo diferente da superfície eletrodo de grafite modificada pelas hemácias sensibilizadas em contato com controle positivo.

O ensaio imunoenzimático para o diagnóstico da infecção por *T. Cruzi* vs cronopotenciometria apresentaram alta correlação, tanto para amostras positivas, como também para amostras negativas, sendo que está última a correlação foi maior.

Em suma, a cela eletroquímica produzida mostrou-se rápida e sensível, um sensor eletroquímico inédito para reação de hemaglutinação de anticorpos específicos contra hemácias sensibilizadas para diagnóstico da doença de Chagas. A cela eletroquímica poderá ser aplicada em sistemas semelhantes, como por exemplo leishmaniose ou qualquer doença que usa hemaglutinação para diagnóstico. Ainda será possível abrir possibilidade para fabricação, desenvolvimento e aplicação de dispositivo portáteis para uso em campo. Por fim acredita-se que a junção dos conceitos e procedimentos desenvolvidos neste trabalho vão colaborar para a melhoria dos sistemas de hemaglutinação para diagnóstico de doenças, principalmente as negligenciadas.



PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA: POTENCIALIDADES DE DIAGNÓSTICO PARA DOENÇAS DE CHAGAS

TECHNOLOGICAL PROSPECT: DIAGNOSTIC POTENTIAL FOR CHAGAS DISEASE

Ayres Fran da Silva e Silva

Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO – Universidade Federal do Piauí – UFPI – Teresina/PI – Brasil – Universidade Federal Rural da Amazônia – UFRA, Campus Parauapebas – PA – PA 275, Km 13, Zona Rural, Parauapebas-PA. CEP: 68.515-000
ayres@ufra.edu.br

Geraldo Eduardo da Luz Júnior

Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO – Universidade Federal do Piauí – UFPI – Teresina/PI – Brasil – Universidade Estadual do Piauí – UESPI, localizado na Rua João Cabral, 2231, bairro Pirajá, zona Norte de Teresina – PI, CEP: 64002-150.
geraldoeduardo@gmail.com



RESUMO

A doença de Chagas é endêmica, principalmente, em países de clima tropical sendo relacionadas à pobreza e ao baixo desenvolvimento, afetando milhões de pessoas no mundo. No Brasil, de 1,8 a 2,4 milhões de indivíduos devam estar na fase crônica da doença, 1/3 deles na forma cardíaca e digestiva. Este trabalho objetiva analisar o grau de desenvolvimento tecnológico através da prospecção tecnológica sobre o diagnóstico da doença de Chagas em busca de patentes e artigos. Para a busca e análise das patentes utilizaram-se as bases de dados do Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI), “European Patent Convention” (EPO), “The United States Patent and Trademark Office” (USPTO), “World intellectual property organization” (WIPO) e

“Esp@cenet-Latipat” (LATIPAT). Para os artigos científicos a base de dados usada foi a “Web of Science”. As patentes mostraram que os biomarcadores são mais protegidos para diagnosticar a doença de Chagas, as publicações de artigos científicos sobre o tratamento e diagnóstico foram expressivas no Brasil, com destaque para Fundação Oswaldo Cruz. Assim, a prospecção destaca um mapeamento, de artigos na base de periódicos “Web of Science” de 2005 a junho de 2015, além patentes que estavam depositadas nos bancos já mencionados acima na data de 10 de junho de 2015, aplicado para o diagnóstico da doença de Chagas.

PALAVRAS-CHAVE: Prospecção. Trypanosoma cruzi. Doença. Diagnóstico.

ABSTRACT

Chagas disease is endemic, mainly in tropical countries being related to poverty and low development, affecting millions of people worldwide. In Brazil, from 1.8 to 2.4 million individuals should be in the chronic phase of the disease, 1/3 of them in heart shape and digestive. This study aims to analyze the degree of technological development through technological prospection on the diagnosis of Chagas disease in search of patents and articles. For the search and examination of patents using the databases of Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI), European Patent Convention (EPO), The United States Patent and Trademark Office (USPTO), World Intellectual Property Organization (WIPO) e Esp@cenet-Latipat (LATIPAT). For the scientific articles database used was the Web of Science. Patents have shown that biomarkers are better protected to diagnose Chagas disease, publications of scientific articles on the treatment and diagnosis were significant in Brazil, especially Fundação Oswaldo Cruz. Thus, the survey highlights a mapping of articles in journals based Web of Science from 2005 to June 2015, besides patents were deposited in banks already mentioned above on the date of June 10, 2015, applied for the diagnosis of Chagas disease.

KEYWORDS:

Prospecting. Trypanosoma Cruzi. Disease. Diagnosis.

INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde (OMS) mostra em seu sítio para "tropical diseases" oito doenças que ocorrem em particular ou especialmente nos trópicos, e explica que, na prática, a designação se refere a doenças infecciosas que proliferam em condições climáticas quentes e úmidas. Algumas dessas doenças são originadas por protozoários como a malária, as leishmaníases, a doença de Chagas e a doença do sono. Outras são causadas por vermes como as

esquistossomíases, a oncocercíase e as filaríases linfáticas. Uma é viral, a dengue (Camargo, 2008).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) destaca que, a doença de Chagas é uma das principais doenças tropicais negligenciadas e responsáveis por óbitos e perda da capacidade de trabalho nos países da América Latina (Hasslocher-Moreno et al., 2013).

A Tripanossomíase Americana conhecida popularmente como doença de Chagas teve sua descoberta feita pelo médico brasileiro Carlos Chagas em 1908, o mesmo, diagnosticou e estudou clinicamente o primeiro caso humano da tripanossomíase em uma criança no ano de 1909. A doença de Chagas é um exemplo histórico em que o agente causal foi descoberto antes da doença propriamente dita. Com o achado, Carlos Chagas homenageou o epidemiologista Oswaldo Cruz com o seu nome no agente causador *Trypanosoma cruzi* (Bezerra et al., 2012).

Estima-se que aproximadamente 14 milhões de pessoas estejam infectadas na América Latina e que 60 milhões estejam em risco de infecção, sendo que, no Brasil, de 1,8 a 2,4 milhões de indivíduos devam estar na fase crônica da doença, 1/3 deles na forma cardíaca e digestiva, gerando alta morbimortalidade (Santos et al., 2012).

Em uma época marcada pelas transformações tecnológicas. A indústria farmacêutica até que apresentou, ao longo de sua história, um ritmo acelerado de inovações tecnológicas que resultaram em um fluxo contínuo de novos produtos no mercado. Essas foram quase sempre implementadas por empresas a partir de elevados investimentos em pesquisa e desenvolvimento tecnológico (P&D), mas em estreita cooperação com outras instituições, em geral públicas ou sem fins lucrativos. Entretanto, no período entre 1975 e 2004, apenas 1% dos 1.535 novos fármacos registrados foram destinados às doenças tropicais (Bezerra et al., 2012; Santos et al., 2012).

Para tratamento para doença de Chagas foram feitas utilizações: atoxyl (arsênico), a tintura de fucsina, o tártaro emético (antimonial pentavalente) e o cloreto de mercúrio, derivado quinoleínico, o bisquinaldina, as aminoquinolinas (pentaquina, isopentaquina

e primaquina), os arsênicos trivalentes, os aminoglicosídeos, nitrofuranos, antibióticos, nifurtimox, o benzonidazol, nitrofurazol, TAK-187, Ravuconazole, Alopurinol, Megazol, Naftoimidazóis, benzonidazol, Posaconazol é um análogo do itraconazol. Os compostos citados não mostraram total eficiência no tratamento proposto, porém o posaconazol, no entanto, teve um efeito mais benéfico em testes feitos em ratos, representando 71% de cura e 100% de sobrevivência (De Oliveira Meneguetti, 2011; Bezerra *et al.*, 2012).

Outra forma de tratamento é utilização Fitoterápicos, plantas medicinais são usadas no tratamento de doenças parasitárias e, vários estudos (Camurça-Vasconcelos *et al.*, 2005; Pinto *et al.*, 2006; Da Silva Sobral *et al.*, 2010; Giraldi e Hanazaki, 2010) corroboram a importância terapêutica atribuída a produtos de origem vegetal, bem como descrevem a atividade tripanossomicida de vários princípios ativos naturais. Diversas classes, como quinonas, flavonóides, alcalóides e terpenos apresentam-se ativas contra o *T. cruzi*. Na região amazônica pode se citar também a *Banisteriopsis caapi* e *Psychotria viridis* que tem ação antitripanosomal contra o *Trypanosoma lewisii* e *T. cruzi*. Essas plantas são utilizadas no preparo de um chá conhecido como (Ayahuasca) que é utilizado em rituais religiosos na região amazônica, tanto por indígenas como pela população local, acredita-se que é devido ao uso desse chá que indígenas não se infectam por *T. cruzi* e *Leishmania sp* (Bezerra *et al.*, 2012; Figueredo *et al.*, 2014).

A tripanossomíase é uma das mais graves endemias do Brasil. O parasita pode ser transmitido aos seres humanos por insetos triatomíneos, alimento contaminado, fezes, via oral, transfusão de sangue ou transplantes de órgãos de doadores infectados e o percurso transplacentária de uma mãe contaminada para seu recém-nascido (Figueredo *et al.*, 2014).

É importante destacar o lapso comumente cometido pelo médico por não incluir a infecção chagásica aguda no rol das doenças febris. Apesar da redução acentuada do número de casos por transmissão vetorial, alertam para a transmissão por outros mecanismos, de interesse também para

países não endêmicos, dada a migração de latino-americanos infectados para os mesmos (Coura e Borges-Pereira, 2012; Rassi e Rassi Junior, 2013; Matsuda *et al.*, 2014).

O diagnóstico clínico da doença de Chagas na fase aguda foi por muito tempo divulgado como sinal de Romaña, que tornou-o excelente marcador para o diagnóstico de fase aguda, permitindo o reconhecimento de maior número de casos. Por outro lado, durante algum tempo, tão arraigada ficou a noção de que fase aguda era igual à presença do sinal de Romaña que se o paciente não o apresentasse a hipótese diagnóstica era descartada, ainda que uma ou outra manifestação do período estivesse presente. O diagnóstico laboratorial da doença de Chagas na fase aguda (Coura e Borges-Pereira, 2012; Rassi e Rassi Junior, 2013; Matsuda *et al.*, 2014).

Consideram como selo diagnóstico da fase aguda o encontro do *T. cruzi* no sangue e outros líquidos orgânicos. Sobre o tratamento específico, salientam o significativo valor do benzonidazol, atualmente fabricado pelo LAFEPE (Recife, PE) e à disposição de interessados, gratuitamente, por solicitação ao Ministério da Saúde. Por fim, súmula de definições de caso é apresentada por Coura e Borges-Pereira (2012), Rassi e Rassi Junior (2013) e Matsuda *et al.* (2014).

O exame complementar específico que deve ser usado para o diagnóstico da fase aguda consiste, basicamente, na demonstração do *T. cruzi* no sangue periférico (exame direto), por meio do exame a fresco, gota espessaou pelo método de concentração de Strout (Coura e Borges-Pereira, 2012; Rassi e Rassi Junior, 2013; Matsuda *et al.*, 2014).

Em geral a evidenciação de *T. cruzi* pelo exame direto só é útil nas primeiras semanas da doença. Há que assinalar que o tempo de doença é variável importante na obtenção do resultado. Por exemplo, nos primeiros 10 dias a partir da contaminação, o resultado comumente é negativo porque não houve tempo para uma multiplicação satisfatória dos parasitos, que se faz, em tese, a cada 5 dias. Por outro lado, após os 30 dias do início dos sintomas, o número de parasitos circulantes decresce, graças

à imunidade que se estabelece (Coura e Borges-Pereira, 2012; Rassi e Rassi Junior, 2013; Matsuda *et al.*, 2014).

Outros métodos usados para o diagnóstico específico, na fase aguda da doença de Chagas, são constituídos por: biópsia da lesão cutânea tida como chagoma, de linfonodo satélite e de músculo esquelético; xenodiagnóstico com exame precoce dos triatomíneos (sexto ao décimo dia após o repasto) (Coura e Borges-Pereira, 2012; Rassi e Rassi Junior, 2013; Matsuda *et al.*, 2014).

Métodos sorológicos, ideal para a fase crônica da doença de Chagas pela baixa parasitemia, são basicamente a hemaglutinação, a imunofluorescência. A hemaglutinação inicia-se pela incubação do soro do paciente com hemácias previamente sensibilizadas com antígeno de *Trypanosoma cruzi* e observação de aglutinação. A imunofluorescência ou teste imunoenzimático (ELISA) incide na incubação de parasitas fixados em lâminas e em contato com soro do paciente, ocorre uma reação entre anticorpos anti-IgG humana do paciente e substâncias que emitem coloração verde à luz violeta; a leitura é feita com microscópio de fluorescência. O ELISA é uma reação imunoenzimática análogo à imunofluorescência, utiliza-se uma enzima como a peroxidase, que acelera a transformação do cromógeno incolor em colorido; a leitura é feita em espectrofotômetro. Para evitar resultados falso-positivos ou falso-negativos, devem ser solicitados sempre dois testes diferentes. A sensibilidade dos testes de fixação do complemento, de imunofluorescência e hemaglutinação são, respectivamente, de 91,5%, 99% e 100% (Coura e Borges-Pereira, 2012; Rassi e Rassi Junior, 2013; Matsuda *et al.*, 2014).

Outro teste que pode ser empregado na detecção de parasitas é amplificação do DNA do *Trypanosoma cruzi* por reação

polimerásica em cadeia. A positividade deste exame pode chegar a 96,5%, porém não é método de rotina devido a seu alto custo e dificuldade técnica de realização do teste (Coura e Borges-Pereira, 2012; Rassi e Rassi Junior, 2013; Matsuda *et al.*, 2014).

Na literatura busca-se uma inovação para um teste rápido com alta sensibilidade, especificidade e estabilidade para o trabalho de campo e banco de sangue emergências, em diferentes áreas geográficas em que diferentes cepas e clones de *T. cruzi*. Os testes disponíveis, tais como, Stat-Pack® e Imbios®, apresentam grande variação na sua sensibilidade e especificidade de acordo com a área geográfica, tal como América Central, Bolívia e a região amazônica, e que deve ser sempre acompanhada por uma segunda teste de confirmação. Portanto, isto é extremamente importante e necessário desenvolver um teste rápido com alta sensibilidade e especificidade (Coura e Borges-Pereira, 2012).

Diante do exposto, Este trabalho objetiva analisar o grau de desenvolvimento tecnológico através da prospecção tecnológica sobre o diagnóstico da doença de Chagas em busca artigos de patentes. Para a busca e análise dos artigos e patentes usou-se base "Web of Science"¹ e as bases de dados do Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI)², "European Patent Convention" (EPO)³, "The United States Patent and Trademark Office" (USPTO)⁴, "World intellectual property organization" (WIPO)⁵ e "Esp@cenet-Latipat" (LATIPAT)⁶.

METODOLOGIA

Para ajudar a prospecção tecnológica, foi feito um levantamento de pedidos de patentes publicados, em que a palavra

¹ webofscience.com

² www.inpi.gov.br

³ www.epo.org

⁴ www.uspto.gov

⁵ www.wipo.int

⁶ p.espacenet.com

doença de Chagas ou *Trypanosoma cruzi* fosse citada.

A pesquisa foi realizada em 10 de junho de 2015. Foram usadas para a busca de pedidos de patentes depositadas as seguintes bases de dados: Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI), European Patent Convention (EPO), The United States Patent and Trademark Office (USPTO), World Intellectual Property Organization (WIPO) e Esp@cenet-Latipat (LATIPAT).

Os artigos foram selecionados na base de periódicos "Web of Science -" as palavras-chave foram usadas na sequência: 1) doença "disease*", 2) Chagas "Chagas*", 3) *Trypanosoma Cruzii* "Trypanosoma Cruzii*", 4) diagnóstico "diagnosis*". Para sequência 1,2 e 3,4 utilizou-se operador "and", já para sequência 3,4 utilizou-se operador "or". A mesma foi refinada para artigos publicados de 2005 a junho de 2015.

A busca no banco de dados foi alcançada da seguinte forma: 1) no INPI em busca avançada no tópico resumo foi introduzido as palavras chaves: doença and chagas or *Trypanosoma cruzi* and diagnóstico; 2) no EPO em busca avançada no tópico título ou resumo foi colocado as palavras chaves: "(disease and Chagas or *Trypanosoma cruzi* and diagnosis)"; 3) no LATIPAT em busca avançada no tópico título ou resumo foi introduzido as palavras chaves: doença and

chagas or *trypanosoma cruzi* and diagnóstico; 4) no WIPO em busca "patentscope" com pesquisa na primeira página das patentes foi feita a busca da seguinte maneira "((disease) and (Chagas) or (*Trypanosoma cruzi*) and (diagnosis))"; 5) no USPTO em pesquisa de patentes "Search for Patents" no tópico Pesquisa de Patentes por texto completo (desde 1976) "Searching Full Text Patents (Since 1976)" escolheu-se o tema pesquisa avançada, para esta pesquisa foi usada as seguintes palavras chaves: "ABST/((disease) and (Chagas) or (*Trypanosoma*) and (*cruzi*) and (diagnosis))". O enfoque da pesquisa foi montar banco de dados de tudo e qualquer tipo de utilização diagnóstica para doença de Chagas.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

O número de artigos publicados por ano está representado na Figura 1, nos anos de 2005 a junho de 2015 foi encontrado 5284 artigos. De 2005 a 2009 ocorreu um crescimento crescente de publicações de artigos. Avendo um decréscimo em 2010. De 2011 a 2014 ocorreu um aumento de publicações. Em 2015 até mês de junho ocorreu 225 publicações de artigos.

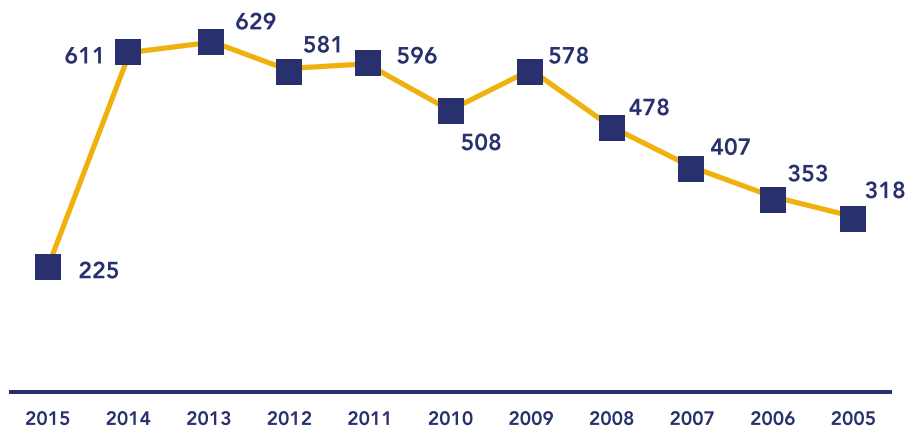


Figura 1 – Número de artigos publicados que envolve o estudo para tratamento e diagnóstico da doença de Chagas por ano.

FONTE: A autoria própria (2015).

A Figura 2 mostra o número de publicações de artigos dos dez países que publicaram sobre a doença de Chagas voltadas ao tratamento e diagnóstico. O Brasil apresentou o melhor desempenho com 2509 publicações, destas 721 publicações foram feitas pela Fundação Oswaldo Cruz, seguida 719 publicações feitas pela Universidade Federal de São Paulo, destaque do maior detentor de recursos para pesquisa a região sudeste. Outra instituição que contribuiu forte para este expressivo número foi a Universidade Federal de Minas Gerais com 411 publicações, isto mostra o caráter a pesquisa científica no Brasil que são feitas quase que exclusivamente por instituições públicas. O segundo país que mais apresentou publicações foi Estados Unidos, com 1211, a

instituição de maior destaque deste país foi Universidade da Georgia. Com 96 publicações. Esta Figura 2 ainda que os países da América são os maiores responsáveis por estas publicações além dos dois citados destaca-se Argentina, com 811 publicações, México, com 285 publicações, Colômbia, com 242 publicações, Venezuela, com 194 publicações, e Chile, com 173 publicações. Isso corrobora com doença de Chagas que é uma tripanossomíase americana causada pelo "hemoflagellate *Trypanosoma cruzi*". De acordo com Organização Mundial da Saúde, existem entre 16 e 18 milhões de pessoas infectadas a partir do sul dos EUA para o sul da Argentina e Chile (Ferreira et al., 2005).

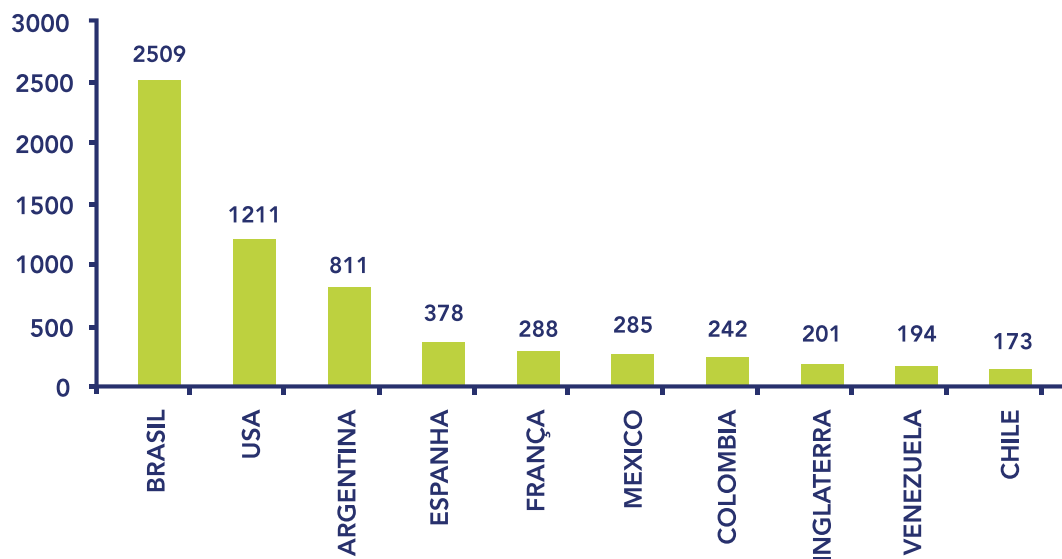


Figura 2 – Número de artigos publicados que envolve o estudo para tratamento e diagnóstico da doença de Chagas para dos dez países que mais publicaram.

FONTE: Autoria própria (2015).

A Figura 3 trás as áreas que mais publicaram de 2005 a junho de 2015. A área de parasitologia contribuiu com 1378 publicações, é natural já que a doença de Chagas é acometida por parasita, por se tratar de uma doença característica dos trópicos, a área de medicina tropical apresentou 1256 publicações, por se tratar de uma doença infecciosa negligenciada (Amato Neto e Pasternak, 2009; Dias et al., 2009; Araújo, 2012), a área de doenças infecciosas colaborou 794 publicações, é notório o desenvolvimento de biomarcadores, esta contribuição

advém do desenvolvimento de áreas consagradas como a bioquímica e biologia molecular, a qual colaborou 543, a farmácia e farmacologia, com 525 publicações, apresentou contribuição devido ao longo do tempo, têm sido feitos investimentos e medidas de enfrentamento e controle dessa doença, principalmente no Brasil líder no seguimento (Nicoletti e Lopes Da Silva, 2014). Mesmo assim, ainda se faz muito pouco (Werneck et al., 2011; Santos et al., 2012), quando comparamos os investimentos em pesquisas que focam outras doenças

de interesse mundial (De Abreu Pedra et al., 2011). São inúmeras as dificuldades no desenvolvimento de tecnologias de pesquisa e desenvolvimento aplicados à prevenção e controle da doença, e entre elas destaca-se para este seguimento urgência no desenvolvimento de novos fármacos, menos tóxicos e mais seguros do que os existentes, além da promoção do fortalecimento das ações de controle e prevenção da doença (Nicoletti e Lopes Da Silva, 2014).

A imunologia, com 506 publicações, é notória a sua contribuição para conhecimento e tratamento da doença cerca de 50 anos, uma série de trabalhos científicos sobre o *Trypanosoma cruzi* e a imunologia, a patogenia, a epidemiologia, o diagnóstico, o tratamento e o controle da doença de Chagas foi desenvolvida no Brasil e em outros países do Continente Sul-americano e do Mundo (Magalhães-Santos, 2015; Souza e Hora, 2015).

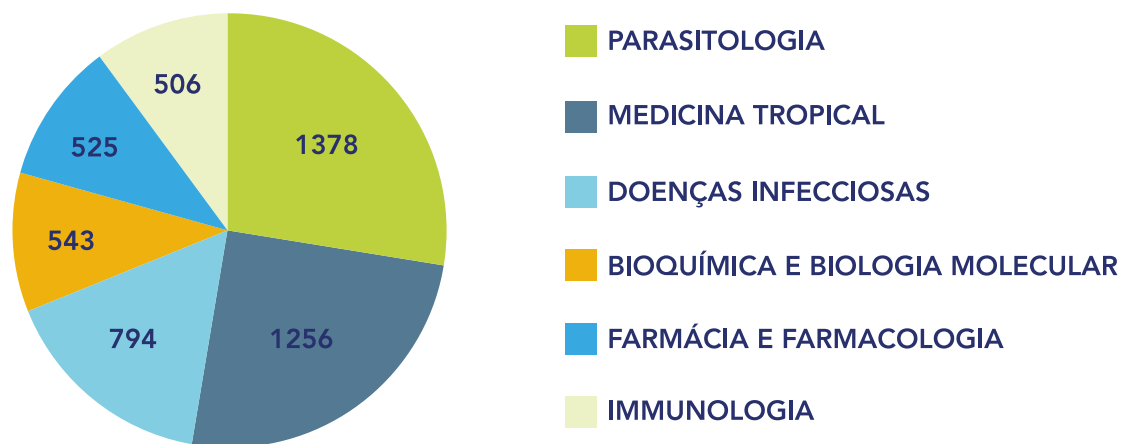


Figura 3 – Áreas do conhecimento que mais publicaram artigos com tratamento e diagnóstico da doença de Chagas.

FONTE: Autoria própria (2015).

A Figura 4 mostra o número de patentes depositadas nas bases de dados: Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI), European Patent Convention (EPO), The United States Patent and Trademark Office (USPTO), World Intellectual Property Organization (WIPO) e Esp@cenet-Latipat (LATIPAT). Os quais segundo a metodologia de pesquisa neste levantamento apresentaram: no INPI com 43 patentes depositadas; no EPO com 18 patentes depositadas; no LATIPAT com 22 patentes depositadas, no USPTO com 6 patentes depositadas e no WIPO com 22 patentes depositadas, este último alcançou o total 22 com famílias de patentes, pois o mesmo apresentou a mesma patente depositada em bancos diferentes.

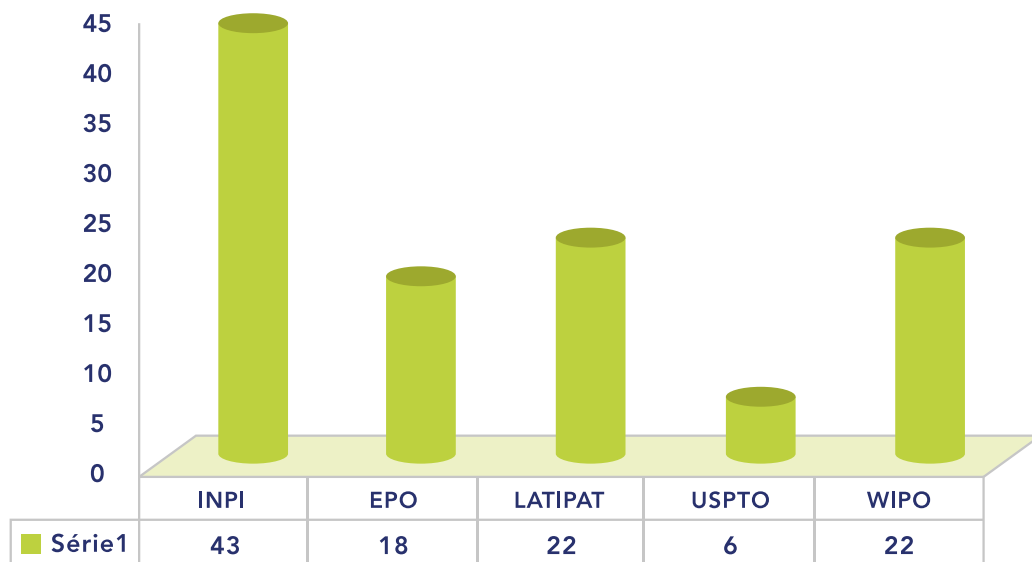


Figura 4 – O número de patentes depositadas nas seguintes bases de dados: Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI), European Patent Convention (EPO), The United States Patent and Trademark Office (USPTO), Word intellectual property organization (WIPO) e Esp@cenet-Latipat (LATIPAT), pesquisa foi realizada em 10 de junho de 2015.

FONTE: Autoria própria (2015).

A Figura 5 mostra a quantidade de patentes por país que fizeram depósitos de patentes nas bases de dados: Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI), European Patent Convention (EPO), The United States Patent and Trademark Office (USPTO), Word intellectual property organization (WIPO) e Esp@cenet-Latipat (LATIPAT). A análise infatiza que Brasil e Estados Unidos são os maiores depositantes, sendo que o Brasil lidera os depósitos feitos no INPI e WIPO com 32 e 8, respectivamente. Os resultados dos depósitos dos Estados Unidos nos bancos de dados: INPI e WIPO com 6 e 6, respectivamente. Os Estados Unidos apresenta liderança de

depósitos EPO e LATIPAT 8 e 7, respectivamente, nestes bancos o Brasil EPO e LATIPAT 6 e 6, respectivamente. Brasil e Estados Unidos apresentaram um empate de 2 depósitos no banco de dados USPTO. Estes depósitos mostram que a proteção da propriedade intelectual visa proteger a inovação nos países mais acarretados da doença negligenciada, causada pelo *Trypanosoma cruzi*, doença popularmente conhecida como doença de Chagas. A baixa quantidade de patentes depositadas para diagnóstico da doença corrobora com baixo registro de fármacos para curar a doença com menos de 1% (Bezerra *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2012).

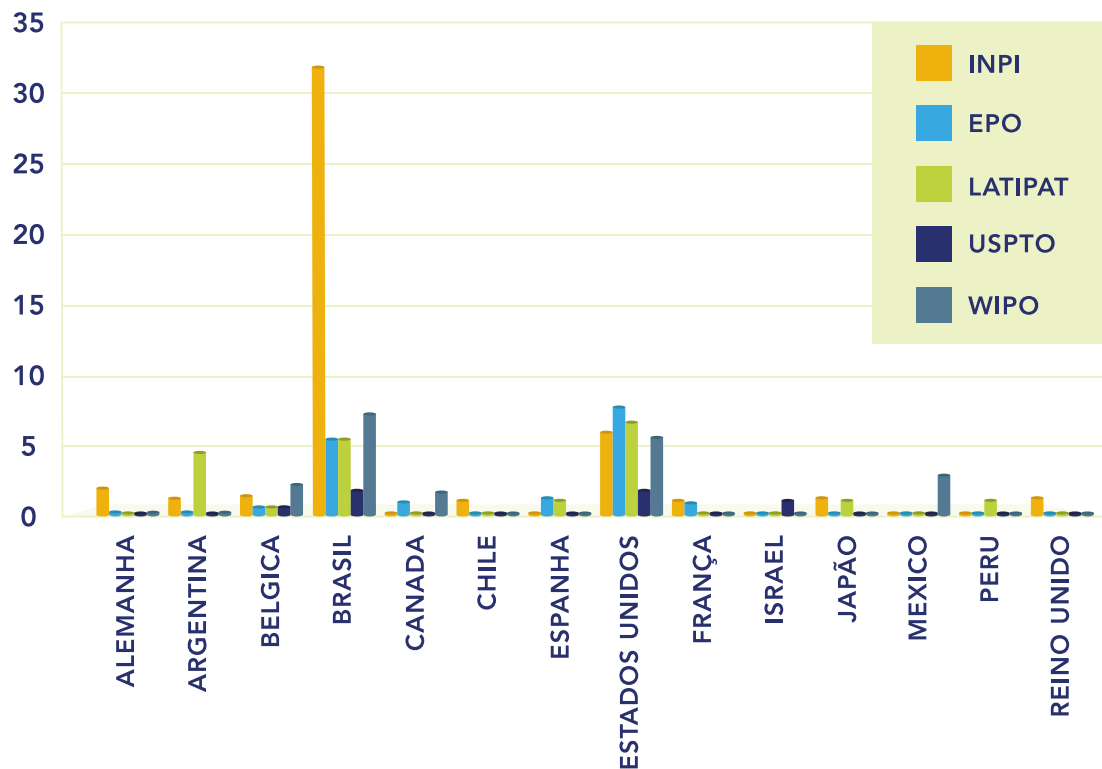


Figura 5 – Mostra a quantidade de patentes por país que fizeram depósitos de patentes na bases de dados: Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI), European Patent Convention (EPO), The United States Patent and Trademark Office (USPTO), Word intellectual property organization (WIPO) e Esp@cenet-Latipat (LATIPAT), pesquisa foi realizada em 10 de junho de 2015.

FONTE: Aatoria própria (2015).

A Figura 6 mostra depósitos de patentes no banco de dados no INPI por estado brasileiro. Estes dados revelam que o principal estado com depósitos de patentes referente ao diagnóstico da doença de Chagas é Rio de Janeiro (RJ) com 10 depósitos, seguido de São Paulo com 9 depósitos, Minas Gerais com 6 depósitos, estados estes situados na região sudeste do Brasil, além destes estados a região nordeste com os estados da Paraíba com 1 depósito, Alagoas com 1 depósito, Piauí com 1 depósito. A região centro oeste com Distrito Federal, apresentou 3 depósitos. A região norte com Pará apresentou com 1 depósito. Esses dados corrobora com nível de distribuição das verbas para fomento a pesquisa científica no país (Botelho e Almeida, 2012).



Figura 6 – Depósitos de patentes no banco de dados no INPI por estado brasileiro.

FONTE: Autoria própria (2015).

A Figura 7 Mostra a quantidade de patentes depositadas por década na bases de dados: Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI), European Patent Convention (EPO), The United States Patent and Trademark Office (USPTO), World intellectual property organization (WIPO) e Esp@cenet-Latipat (LATIPAT).

Os resultados nesta busca por depósitos de patentes por década nas diferentes bases de dados revelaram que 1972 a 1982 apenas WIPO e EPO receberam depósitos. De 1982 a 1992 todas as bases receberam depósitos, WIPO foi a que apresentou maior número patentes depositadas com 4 depósitos.

De 1992 a 2002, a WIPO continuou aumentando o número de depósitos para 8. Mais INPI apresentou um aumento significativo da década passada, a qual a apresentou apenas 1 depósito, o número aumentou para 17 depósitos, responsáveis por esta proeza foi iniciativa principalmente das instituições públicas destacaram-se nestes depósitos: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP; Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz); Universidade Federal de São Paulo e Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, todas estas instituições são oriundas da região sudeste, região de maior detentor das verbas para fomento de pesquisa (Botelho e Almeida, 2012).

De 2002 a 2014 as bases INPI, WIPO, EPO e LATIPAT, mantiveram o crescimento, avendo um decrescimo na base de dados USPTO, mais uma vez liderança na década ficou com INPI com 28 depósitos, mais uma vez as instituições públicas foram responsáveis pelo aumento na quantidade dos depósitos, desta vez não só as instituições públicas da região sudeste foram responsáveis, sendo ainda elas com maior destaque: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP; Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz); Universidade Federal de São Paulo e Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, a este grupo seletto juntou-se uma instituição do centro oeste: Fundação Universidade de Brasília, instituições do nordeste: Universidade Federal da Paraíba; Universidade Federal de Alagoas e a Universidade Federal do Piauí. De 2002 a 2014 ainda contribuiu a Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, mais as grandes contribuintes para o crescimento dos depósitos nos bancos de dados do INPI foram: Universidade Federal de Minas Gerais” UFMG em parceria com a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais” FAPEMIG.

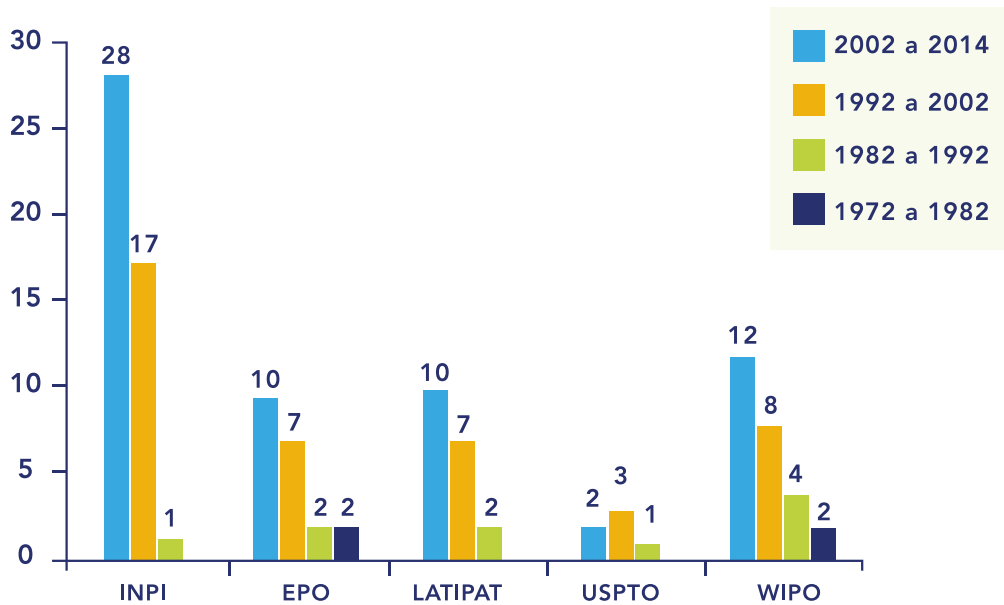


Figura 7 – Mostra a quantidade de patentes depositadas por década na bases de dados: Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI), European Patent Convention (EPO), The United States Patent and Trademark Office (USPTO), World intellectual property organization (WIPO) e Esp@cenet-Latipat (LATIPAT).

FONTE: Aatoria própria (2015).

É possível observar na Figura 8 os principais processos para diagnosticar a doença de Chagas. As patentes referentes a estes processos foram depositadas por década na bases de dados: INPI, EPO, LATIPAT, USPTO e WIPO.

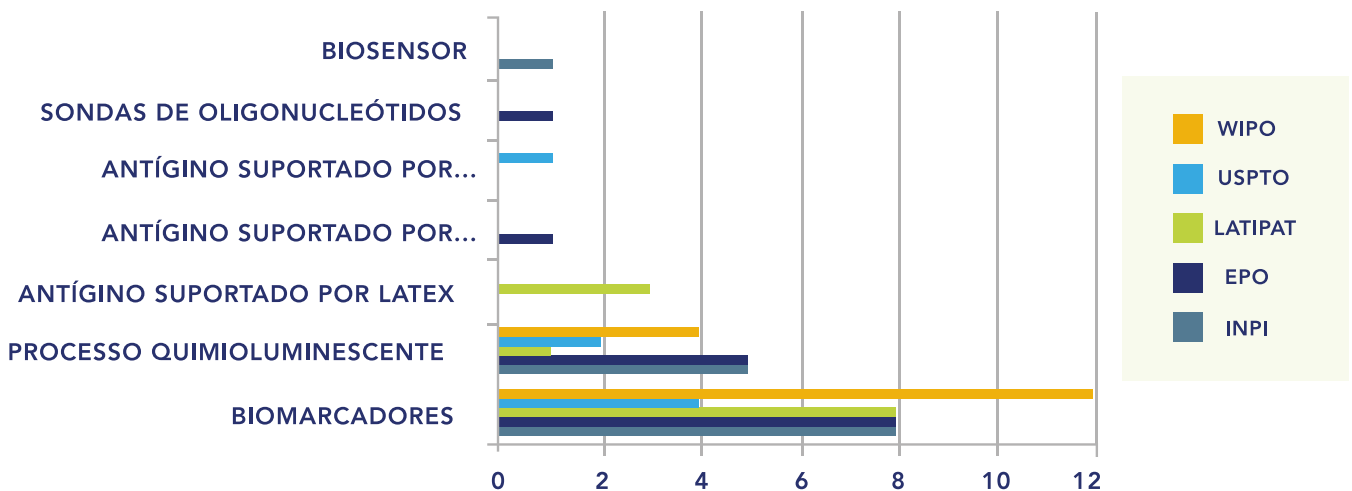


Figura 8 – Os principais processos para diagnosticar a doença de Chagas.

FONTE: Aatoria própria (2015).

No INPI foi verificado um depósito de um biosensor para doença de chagas, conforme mostra na Figura 8, a patente do mesmo não estava disponível para leitura,

mais a literatura desta que este mecanismo de diagnóstico são muito rápidos e tem tanto uma elevada especificidade e sensibilidade. Além disso, eles têm a vantagem

de exigir pequenos volumes de amostras que proporcionam um aumento no número de amostras analisadas, reduzindo assim os custos quando comparado com os métodos analíticos convencionais (Ferreira et al., 2005). No USPTO e EPO, apresentaram patentes para transportadores de antígenos no primeiro o transportador lipoproteína e no segundo uma glicoproteína.

A Figura 8 mostra que LATIPAT apresenta 3 depósitos de patentes referentes ao processo para diagnosticar doença de chagas, tendo como suporte para o antígeno, o látex. Os depositantes são "Consejo Nac Invest Cient Tec e Univ Nac Del Litoral", ambos da Argentina, os mesmos fazem parte dos 3 depósitos, como não foi possível o acesso as patentes, não foi possível identificar a técnica para obter o complexo antígeno e látex. Mais estudos apontam para látex poliméricos em emulsão.

Próximo de completar 100 anos da sua divulgação da obtenção de látex por polimerização em emulsão tornou-se uma técnica bastante conhecida no mundo, estes sistemas constituem-se com grande aplicação industrial e tecnológica. Na literatura costa que são largamente usados na produção filmes plásticos, materiais elásticos, couro artificial, têxteis impermeáveis, tintas, adesivos, recobrimento de papel, pneus, em estudados como sistemas de modelo em físico-química de colóides e nas últimas décadas tem voltado suas atenções para produção de materiais biomédicos e biotecnológicos (Cardoso et al., 1992; Neto, 1994; Forcada e Hidalgo-Alvarez, 2005; Schiavetto et al., 2009).

O látex de poliestireno pela facilidade de adequação/modificação da superfície pode ser utilizado em reações antígeno-anticorpo. A estreita distribuição de tamanho das partículas do latex funcionalizados contendo grupos reativos, como hidroxila, aldeído, carboxila e etc., fazem do poliestireno o suporte de complexos antigino-anticorpo de alguns imunoenaios (ou imunodiagnósticos) (Gonzalez, Gugliotta, Giacomelli, et al., 2008; Gonzalez, Gugliotta e Meira, 2008; Gonzalez et al., 2010).

As proteínas estão vinculadas ao látex por adsorção física e/ou ligação química.

Estudos relatam que a ligação química é adequada uma vez que melhora a estabilidade do látex, assim reduzindo o risco de desnaturação de proteínas. Imunodiagnósticos testes são prontamente visualizadas por reações de aglutinação (Kristensen et al., 2001; Kesari et al., 2005; Gonzalez, Gugliotta, Giacomelli, et al., 2008; Gonzalez, Gugliotta e Meira, 2008; Kim et al., 2009; Gonzalez et al., 2010).

Na Figura 8 mostram que todas as bases apresentaram depósitos referentes a processos que envolvem o emprego quimioluminescente, estudos mostram que o diagnóstico da infecção pelo *T. cruzi* é baseado em epidemiologia e clínicas, mas deve ter sua etiologia confirmada por diagnóstico laboratorial. Este último pode ser realizada por meio de visualização direta do parasita ou por meio da resposta imunológica do hospedeiro infectado. Estas patentes depositadas apontam para um avanço no diagnóstico na fase aguda da doença de Chagas pelo processo quimioluminescente. Os processos quimioluminescentes existentes de forma rotineira só busca o diagnóstico etiológico da doença de Chagas na fase crônica (Ferreira et al., 2005; Bernardes-Engemann et al., 2014; Chambela, 2014; Repolês, 2014).

A Figura 8 mostra que o principal desenvolvimento de patentes encontra-se no processo que envolve a utilização de biomarcadores, estes podem ser definidos como variáveis genéticas, imunológicas e bioquímicas que se relacionam com expressão de doença. Estudos revelam que avanço no conhecimento sobre o binômio, infecção doença, tem mudado o conceito das doenças infecciosas e os marcadores biológicos tem tido um importante papel nesta área. Nas doenças inflamatórias crônicas e nas doenças neoplásicas estes marcadores se relacionam com atividade ou remissão do processo patológico, contribuindo de modo importante como guia de tratamento. Nos processos infecciosos, como a expressão da doença varia de formas assintomáticas, oligossintomáticas à doença clássica, estes marcadores têm um papel importante como valor preditivo de evolução clínica. Do ponto de vista genético é amplamente conhecida a associação de doença com antígenos e

mais recentemente a expressão clínica de doenças (Schriefer e Carvalho, 2008; Em Cardiologia–Parte e Cardíaca, 2014; Em Biomarcadores, 2015; Interativas, 2015).

CONCLUSÕES

Nota-se que, ao longo do tempo, têm sido feitos investimentos e medidas de enfrentamento e controle da doença de Chaga no Brasil e no mundo. No Brasil destaca-se pelas instituições públicas e principalmente pela Fundação Oswaldo Cruz com publicação de artigos e patentes nos bancos de dados aqui analisados, tornando o Brasil líder no seguimento. Mesmo assim, ainda se faz muito pouco, quando comparamos os investimentos em pesquisas que focam outras doenças de interesse mundial.

As pesquisas permitiram que doença de Chagas no Brasil fosse controlada através de inseticidas, levando a uma redução da infestação populacional. As medidas de controle para erradicar as populações de espécies de triatomíneos nativos têm reduzido significativamente o risco de doença de Chagas transmitida por insetos hematófagos contaminados.

Não obstante, a contaminação por transfusão de sangue é um problema grave em países onde o rastreio de doadores de banco de sangue não incluem monitoramento do soro para este tornando a um agente infeccioso.

Para amenizar esse problema. A busca feita mostra que há um desenvolvimento significativo em biomarcadores altamente seletivo, mais que demanda alto investimento financeiro. O processo quimioluminescente também apresenta inovação, mais com menor sensibilidade e custo elevado para os países acometidos da doença, sonda e biosensor, nesta área foi revelado, os mesmos são rápidos e seletivos, mais necessitam de grandes investimentos para testes de acordo com a área geográfica. Suportes e transpotadores de antígenos apresentaram como um caminho viável para inovação tecnológica, pois os mesmos podem

trazer inovação para um teste rápido com alta sensibilidade, especificidade e estabilidade para o trabalho de campo e banco de sangue emergências, em diferentes áreas geográficas.

AGRADECIMENTOS

A Prof^a. Maria Rita M. S. Santos da Universidade Federal do Piauí – UFPI. ©

REFERÊNCIAS

AMATO NETO, V.; PASTERNAK, J. Centenário da doença de Chagas. **Revista de Saúde Pública**, v. 43, n. 2, p. 381-382, 2009. ISSN 0034-8910.

ARAÚJO, J. D. D. Polarização epidemiológica no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 21, n. 4, p. 533-538, 2012. ISSN 1679-4974.

BERNARDES-ENGEMANN, A. R. et al. Esporotricose em crianças e adolescentes atendidos no HUPE-UERJ entre 1997 e 2010: estudo clinicoepidemiológico. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**, v. 13, n. 5, 2014. ISSN 1983-2567.

BEZERRA, W. S.; DE OLIVEIRA MENEGUETTI, D. U.; CAMARGO, L. M. A. A busca de fármacos para tratamento da tripanossomíase americana: 103 anos de negligência. **Saúde (Santa Maria)**, v. 38, n. 1, p. 09-20, 2012. ISSN 2236-5834.

BOTELHO, A.; ALMEIDA, M. Desconstruindo a política científica no Brasil: evolução da descentralização da política de apoio à pesquisa e inovação. **Sociedade e Estado**, v. 27, n. 1, p. 117-132, 2012. ISSN 0102-6992.

CAMARGO, E. P. Doenças tropicais. **estudos avançados**, v. 22, n. 64, p. 95-110, 2008. ISSN 1806-9592.

CAMURÇA-VASCONCELOS, A. et al. Validação de plantas medicinais com atividade anti-helmíntica. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 7, n. 3, p. 97-106, 2005.

CARDOSO, A. L. H.; CARDOSO, A.; GALEMBECK, F. Obtenção e Caracterização de Látex Copoliméricos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, 1992.

CHAMBELA, M. D. C. Avaliação das concentrações de citocinas séricas de pacientes em diferentes estágios da doença de Chagas. 2014.

COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: What is known and what should be improved: a systemic review. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 3, p. 286-296, 2012. ISSN 0037-8682.

DA SILVA SOBRAL, F. E.; BRANDÃO, P. A.; ATHAYDE, A. C. R. Utilização de fitoterápicos no tratamento de parasitoses em galinhas caipira criadas em sistema semi-extensivo. **AGROPECUÁRIA CIENTÍFICA NO SEMIÁRIDO**, v. 6, n. 1, p. 1-6, 2010. ISSN 1808-6845.

DE ABREU PEDRA, R. et al. Desafio em saúde pública: tratamento

etiológico da Doença de Chagas na fase crônica. **Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba. ISSN eletrônico 1984-4840**, v. 13, n. 2, p. 5-9, 2011. ISSN 1984-4840.

DE OLIVEIRA MENEGUETTI, D. U. **INFECÇÃO NATURAL DE TRIATOMÍNEOS (HEMIPTERA: REDUVIIDAE) POR TRIPANOSOMATÍDEOS NO MUNICÍPIO DE OURO PRETO DO OESTE, RONDÔNIA, BRASIL: UMA ABORDAGEM MULTIDISCIPLINAR**. 2011. UNIVERSIDADE LUTERANA DO BRASIL

DIAS, L. C. et al. Quimioterapia da doença de Chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. **Química Nova**, 2009. ISSN 0100-4042.

EM BIOMARCADORES, G. D. E. Biomarcadores em Cardiologia-Parte 2: Na Doença Coronária, Doença Valvar e Situações Especiais. **Arq Bras Cardiol**, v. 104, n. 5, p. 337-346, 2015.

EM CARDIOLOGIA-PARTE, B.; CARDÍACA, N. I. Artigo Especial. **Arq Bras Cardiol**, v. 103, n. 6, p. 451-459, 2014.

FERREIRA, A. A. P. et al. Immunosensor for the diagnosis of Chagas' disease. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 21, n. 1, p. 175-181, 2005. ISSN 0956-5663.

FIGUEREDO, F. G. et al. Avaliação das potenciais atividades tripanocida e antileishmania do extrato de folhas de Piper arboreum (Piperaceae) e de suas frações. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 35, n. 1, p. 149-154, 2014. ISSN 2179-443X.

FORCADA, J.; HIDALGO-ALVAREZ, R. Functionalized polymer colloids: Synthesis and colloidal stability. **Current Organic Chemistry**, v. 9, n. 11, p. 1067-1084, 2005. ISSN 1385-2728.

GIRALDI, M.; HANAZAKI, N. Uso e conhecimento tradicional de plantas medicinais no Sertão do Ribeirão, Florianópolis, SC, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, n. 2, p. 395-406, 2010.

GONZALEZ, V. D. et al. Immunodiagnosis of Chagas disease: synthesis of three latex-protein complexes containing different antigens of *Trypanosoma cruzi*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 77, n. 1, p. 12-17, 2010. ISSN 0927-7765.

GONZALEZ, V. D. et al. Latex of immunodiagnosis for detecting the Chagas disease: II. Chemical coupling of antigen Ag36 onto carboxylated latexes. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 19, n. 2, p. 789-795, 2008. ISSN 0957-4530.

GONZALEZ, V. D.; GUGLIOTTA, L. M.; MEIRA, G. R. Latex of

immunodiagnosis for detecting the Chagas disease. I. Synthesis of the base carboxylated latex. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 19, n. 2, p. 777-788, 2008. ISSN 0957-4530.

HASSLOCHER-MORENO, A. M. et al. Atenção integral e eficiência no Laboratório de Pesquisa Clínica em Doenças de Chagas do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, 2009-2011. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 22, n. 2, p. 295-306, 2013. ISSN 1679-4974.

INTERATIVAS, F. R. S. Pesquisa desenvolve imunizante que controla o avanço da doença de Chagas. 2015.

KESARI, R. et al. Suitability of dyed latex bead agglutination test for immunodiagnosis of Karnal bunt (*Tilletia indica*) teliospores in a single seed of wheat. **Food and agricultural immunology**, v. 16, n. 1, p. 73-81, 2005. ISSN 0954-0105.

KIM, S. et al. Synthesis of polystyrene nanoparticles with different surface modification by emulsion polymerization and measurement of IgG adsorption and stability for the application in latex-protein complex based solid-phase immunoassay. **Polymer Bulletin**, v. 62, n. 1, p. 23-32, 2009. ISSN 0170-0839.

KRISTENSEN, B.; HØJBJERG, T.; SCHØNHEYDER, H. C. Rapid immunodiagnosis of streptococci and enterococci in blood cultures. **Apmis**, v. 109, n. 4, p. 284-288, 2001. ISSN 1600-0463.

MAGALHÃES-SANTOS, Í. F. Transmissão oral da Doença de Chagas: breve revisão. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 13, n. 2, p. 226-235, 2015. ISSN 2236-5222.

MATSUDA, C. N. et al. Doença de Chagas. **RBM rev. bras. med**, v. 71, n. 10, 2014. ISSN 0034-7264.

NETO, J. M. M. **Caracterização de latex poliestirenicos por centrifugação em gradiente de densidade**. 1994. Doutorado em Química Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas.

NICOLETTI, M. A.; LOPES DA SILVA, E. CONTROLE E TRATAMENTO DAS DOENÇAS NEGLIGENCIADAS: VISÃO DA SITUAÇÃO ATUAL. **Revista Saúde-UnG**, v. 7, n. 3-4, p. 65-81, 2014. ISSN 1982-3282.

PINTO, E. D. P. P.; AMOROZO, M. C. D. M.; FURLAN, A. Conhecimento popular sobre plantas medicinais em comunidades rurais de mata atlântica-Itacaré, BA, Brasil. **Acta Botanica Brasílica**, v. 20, n. 4, p. 751-762, 2006.

RASSI, A.; RASSI JUNIOR, A. Doença de Chagas aguda. **Sociedade Brasileira de Clínica Médica; Lopes AC, Guimarães HP, Lopes RD, Vendrame LS (org) PROURGEM Programa de Atualização em Medicina de Urgência e Emergência: Ciclo**, v. 7, p. 41-85, 2013.

REPOLÊS, L. C. Avaliação do método confirmatório FC-TRIPLEX-IgG1 no esclarecimento diagnóstico e na monitoração sorológica para doença de Chagas em bancos de sangue. 2014.

SANTOS, F. L. A. D. et al. Pesquisa, desenvolvimento e inovação para o controle das doenças negligenciadas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n. 1, p. 37-47, 2012. ISSN 2179-443X.

SCHIAVETTO, M. G. et al. Síntese e caracterização de esferas monodispersas de látex e sua utilização no preparo de filmes de cristais coloidais tridimensionais. **Eclética Química**, v. 34, n. 4, p. 79-86, 2009. ISSN 0100-4670.

SCHRIEFER, A.; CARVALHO, E. M. Biomarcadores em medicina. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 78, n. 1, 2008. ISSN 0016-545X.

SOUZA, C. T. V. D.; HORA, D. L. D. Produção de conhecimento em saúde na pesquisa clínica: contribuições teórico-práticas para a formação do docente. **Revista Brasileira de Pós-Graduação**, v. 11, n. 26, 2015.

WERNECK, G. L.; HASSELMANN, M. H.; GOUVÊA, T. G. Panorama dos estudos sobre nutrição e doenças negligenciadas no Brasil. **Ciênc Saúde Coletiva**, v. 16, n. 1, p. 39-62, 2011.