

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

STELLA SCHUSTER DA SILVA

DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO PARA
DETECÇÃO NÃO-INVASIVA DA BACTÉRIA *HELICOBACTER PYLORI* EM
AMOSTRAS DE SALIVA

CURITIBA

2023

STELLA SCHUSTER DA SILVA

DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO PARA DETECÇÃO
NÃO-INVASIVA DA BACTÉRIA *HELICOBACTER PYLORI* EM AMOSTRAS DE
SALIVA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Biomedicina, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Profa. Dra. Carolina Camargo de Oliveira

Coorientador: Prof. Dr. Marcio Vidotti

CURITIBA

2023

Mantenha essa página em branco para inclusão do termo/folha de aprovação assinado e digitalizado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família pelo suporte não só durante o desenvolvimento deste trabalho, mas ao longo de toda a graduação. Agradeço também aos meus amigos pelo incentivo, pelo companheirismo e pela paciência e compreensão por todos os momentos que deixei de estar com vocês para executar esse trabalho. Sem vocês, nada disso teria sido possível.

Agradeço a minha orientadora, Profa. Dra. Carolina Camargo de Oliveira, pela orientação desde 2021. Você abriu diversas portas para o meu desenvolvimento acadêmico e profissional e teve um papel fundamental na minha aprendizagem. Sem a sua contribuição, eu não estaria aqui hoje, participando desse projeto que gosto tanto, por isso devo a você também todas as minhas conquistas durante esse período.

Agradeço minhas colegas Alecsandra, Bruna e Tatiana que são cientistas inspiradoras e me ensinaram tudo o que eu sei sobre eletroquímica. Também devo a vocês as minhas conquistas. Agradeço aos grupos de pesquisa GPMin e LCIN e todos os seus alunos que me ajudaram durante o dia a dia dos experimentos. Seja me mostrando onde ficam os reagentes, seja me ajudando a usar o Origin, vocês também foram importantes para a execução desse trabalho.

Agradeço também a todos os professores que contribuíram com esse trabalho, especialmente a Prof. Dra. Fernanda Simas, o Prof. Dr. Márcio Vidotti, que também me ensinou muito e ofereceu diversas oportunidades de crescer como cientista, a Prof. Dra. Jaqueline Carvalho e a Prof. Dra. Daniela Gradia, e suas alunas Carla e Ana Flávia, que me ensinaram MUITO sobre biologia molecular e nos auxiliaram durante os perrengues com os primers. Para mais, agradeço nossos colaboradores da Universidade Tecnológica de Chemnitz pelo apoio e fornecimento dos anticorpos, proteínas e primers utilizados.

Por fim, agradeço aos Centro de Microscopia Eletrônica (CME – UFPR) pelas imagens de MEV e às agências de fomento CAPES e CNPq. E agradeço à Universidade Federal do Paraná, por ter sido meu lar e comunidade desde 2019.

“Só quem já os experimentou pode avaliar os atrativos
que a ciência oferece e seu poder de absorção.
Em estudos de outra natureza, chegamos até
um determinado limite onde nada mais há a aprender.
Mas na pesquisa científica os horizontes são ilimitados”.

Frankenstein, Mary Shelley

RESUMO

A infecção pela bactéria carcinogênica *Helicobacter pylori* acomete mais de metade da população mundial, com maior prevalência em países subdesenvolvidos, e está associada ao desenvolvimento de doenças como gastrite crônica, úlcera péptica e câncer gástrico. O padrão-ouro para diagnóstico da infecção é o exame histopatológico feito a partir de biópsia de da mucosa gástrica obtida por endoscopia digestiva, que é um exame invasivo, complexo e demorado que demanda profissionais altamente qualificados. Em busca de uma alternativa diagnóstica mais acessível, fácil e não-invasiva, no presente trabalho foi desenvolvido um biossensor eletroquímico impedimétrico para detecção de antígeno de *H. pylori* em amostras de saliva. O biossensor foi construído a partir de eletrodo de grafite impresso modificado com nanotubos de polipirrol e hidróxido de níquel, sobre o qual foram imobilizados anticorpos anti-HopQ, uma proteína estrutural da bactéria importante para sua adesão ao epitélio do estômago. A construção do biossensor foi caracterizada por microscopia eletrônica de varredura e eletroquimicamente. A detecção da proteína-alvo foi realizada através da técnica de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS). A curva analítica do biossensor foi construída em amostras de saliva artificial adicionadas da proteína HopQ comercial. A faixa linear de detecção do método é de 0,5 pg/mL a 3 ng/mL, com limite de quantificação (LOQ) de 0,5 pg/mL. Amostras reais de saliva adicionadas da proteína comercial também foram testadas para validação do dispositivo. O biossensor eletroquímico baseado em EIS desenvolvido combina materiais inovadores e técnicas eletroquímicas altamente sensíveis para detecção do antígeno HopQ da *H. pylori* em baixas concentrações em amostras de saliva em 15 minutos. Dessa forma, é possível vislumbrar uma alternativa para o diagnóstico não-invasivo e precoce da infecção, essencial para prevenção do desenvolvimento de doenças mais graves, como o câncer. Mais estudos são necessários para validar a aplicação do biossensor em um contexto clínico.

Palavras-chave: *Helicobacter pylori*. Biossensor eletroquímico. Saliva.

ABSTRACT

The carcinogenic bacterium *Helicobacter pylori* infection affects over half the world population, with higher prevalence in developing countries. It is associated with the development of diseases such as chronic gastritis, peptic ulcer and gastric cancer. The gold standard diagnostic method is histopathological evaluation of gastric biopsy tissue from upper digestive endoscopy, which is invasive, complex, time-consuming and requires highly trained professionals. In search of a more accessible, easy and non-invasive diagnostic alternative, in this work an impedimetric electrochemical biosensor for *H. pylori* antigen detection in saliva samples was developed. The biosensor platform was developed using a screen-printed electrode modified with polypyrrole nanotubes and nickel hydroxide, where anti-HopQ antibodies, an important outer membrane protein essential for *H. pylori* adhesion to the gastric epithelium, were immobilized. The biosensor construction was characterized by scanning electron microscopy and electrochemical techniques. The target analyte was detected by Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS). An analytical curve was obtained in artificial saliva samples spiked with the commercial HopQ protein. The linear detection range of this method is 0.05 pg/mL to 3 ng/mL, with a limit of quantification (LOQ) of 0.5 pg/mL. The biosensing platform was also validated using real saliva samples spiked with the commercial protein. This electrochemical biosensor based on EIS combines innovative materials and highly sensitive electrochemical techniques for *H. pylori* HopQ antigen detection in low concentrations in saliva samples in 15 minutes. Therefore an alternative for non-invasive and early diagnosis of the infection was proposed, which is essential for prevention of more severe diseases, such as cancer. Further studies are necessary to validate the biosensor application in a clinical setting.

Keywords: *Helicobacter pylori*. Electrochemical biosensor. Saliva.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. (a) Morfologia em bastão da <i>H. pylori</i> em microscopia óptica e (b) em microscopia eletrônica de varredura, e (c) morfologia cocóide da <i>H. pylori</i> em microscopia óptica e (d) em microscopia eletrônica de varredura.....	20
FIGURA 2. Prevalência mundial da infecção por <i>H. pylori</i>	21
FIGURA 3. Mecanismos de virulência da <i>H. pylori</i>	24
FIGURA 4. Diagrama de Nyquist exemplificando uma simulação de EIS e seus principais componentes.....	34
FIGURA 5. Esquema da construção do biossensor.....	39
FIGURA 6. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de (a) PPI-NTs e (b) PPI-NTs/Ni(OH) ₂	43
FIGURA 7. (a) Caracterização dos materiais por voltametria cíclica e (b) Caracterização passo-a-passo da construção do biossensor por EIS.....	45
FIGURA 8. (a) Diagrama de Nyquist mostrando a resposta do biossensor frente ao incremento na concentração de proteína e (b) Curva analítica correspondente.....	47
FIGURA 9. Resultado do primer-BLAST.....	48
FIGURA 10. Gráficos de (a) Amplificação de uma das amostras testadas e (b) Dados não-normalizados de fluorescência por ciclo de uma das amostras.....	49
FIGURA 11. Gráficos de (a) Amplificação de uma das amostras testadas e (b) Dados não-normalizados de fluorescência por ciclo de uma das amostras.....	50
FIGURA 12. Corrida eletroforética em gel de agarose dos produtos amplificados com os primers para <i>H. pylori</i>	51
FIGURA 13. Resultado do eletroferograma e BLAST para a sequência (a), (b) <i>forward</i> e (c), (d) <i>reverse</i>	52
FIGURA 14. Diagramas de Nyquist para duas amostras de saliva.....	54

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Sensibilidade e especificidade de métodos diagnósticos para infecção por <i>H. pylori</i>	30
TABELA 2. Valores de Rct para a caracterização passo-a-passo da construção do biossensor.....	46
TABELA 3. Valores em ΔRct dos biossensores com saliva e após adição da proteína-alvo.....	54

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 CONTEXTO E PROBLEMA	16
1.2 OBJETIVOS	18
1.3 JUSTIFICATIVA	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 HELICOBACTER PYLORI	20
2.2 DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO	27
2.3 BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS.....	31
3 MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1 BIOSSENSOR.....	37
3.1.1 MODIFICAÇÃO DOS ELETRODOS	37
3.1.2 CONSTRUÇÃO DO BIOSSENSOR	38
3.2 AVALIAÇÃO DO BIOSSENSOR	39
3.2.1. DETECÇÃO DA PROTEÍNA-ALVO.....	39
3.2.2 Detecção em amostras de saliva.....	39
3.2.2.1 Caracterização das amostras de saliva	39
3.2.2.2 Detecção em amostras previamente caracterizadas.....	41
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1 CONSTRUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO BIOSSENSOR.....	43
4.2 AVALIAÇÃO ANALÍTICA DO BIOSSENSOR.....	46
4.3 CARACTERIZAÇÃO DE AMOSTRAS DE SALIVA	47
4.4 DETECÇÃO EM AMOSTRAS CLÍNICAS DE SALIVA	53
REFERÊNCIAS	63

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONTEXTO E PROBLEMA

A infecção por *Helicobacter pylori* é considerada a infecção por bactéria mais comum do mundo (Cardos *et al.*, 2022). Estima-se que mais da metade da população mundial esteja infectada, mas há maior prevalência em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, como o Brasil, onde a prevalência chega a 90%, especialmente em regiões de baixa condição socioeconômica, devido às más condições de higiene e saneamento (Mao *et al.*, 2021; World Gastroenterology Organisation Global Guideline: *Helicobacter pylori* in Developing Countries; Brown *et al.*, 2000). A bactéria é reconhecida como agente carcinogênico de Grupo 1 (ou seja, comprovadamente carcinogênico) pela Agência Internacional de Pesquisa com Câncer (IARC) e sua infecção está diretamente relacionada ao desenvolvimento de doenças como gastrite crônica, úlcera péptica e câncer gástrico, uma das cinco principais causas de morte por câncer no mundo (Diretrizes da Organização Mundial de Gastroenterologia, 2021) e outras doenças extra-gástricas, como anemia, diabetes mellitus tipo 2 e doenças isquêmicas do coração. Inclusive, a identificação dessa infecção bacteriana como a principal causa de gastrite crônica e úlceras pépticas em 1984 rendeu o prêmio Nobel em Medicina aos pesquisadores Marshall e Warren em 2005 (Malfertheiner *et al.*, 2023; Mao *et al.*, 2021).

A patogenicidade dessa infecção se deve a diversos fatores de virulência. Entre eles, a enzima urease, responsável pela conversão de ureia em dióxido de carbono e amônia, alcalinizando o pH estomacal; proteínas e toxinas secretadas, como a CagA (do inglês, *cytotoxin-associated gene*) e VacA (do inglês, *vacuolating cytotoxin*), responsáveis por causar apoptose das células do epitélio gástrico por diversos mecanismos; e proteínas adesinas responsáveis pela fixação do microrganismo no epitélio gástrico, como a BabA (do inglês, *blood group antigen-binding protein*) e a SabA (do inglês, *sialic acid-binding adhesin*), e entre elas proteínas de membrana como as da família Hop (do inglês, *Helicobacter outer membrane porin*). Essas proteínas podem servir como biomarcadores para diagnóstico da infecção e a proteína HopQ foi escolhida para o desenvolvimento do presente trabalho. Essa proteína utiliza a família das moléculas de adesão celular relacionadas ao antígeno carcinoembrionário como receptores para interagir com as células do hospedeiro e

atua no processo de transferência do fator de virulência CagA para as células hospedeiras. O alelo *hopQ I* do gene codificante dessa proteína é o mais comum e está correlacionado a genótipos mais virulentos da bactéria (Xu *et al.*, 2020; Sharndama; Mba, 2022).

O tratamento deve ser feito sempre que há diagnóstico da infecção, sendo que testagem em massa e tratamento para erradicação da bactéria é uma das principais estratégias para prevenção do câncer gástrico, considerando que essa intervenção antes do estabelecimento de lesões pré-neoplásicas como displasia e metaplasia pode interromper o desenvolvimento do câncer gástrico (Coelho *et al.*, 2018; Chiang *et al.*, 2022; Machado-Junior *et al.*, 2021; Diretrizes da Organização Mundial de Gastroenterologia, CCATES, 2014). O aumento da resistência a antibióticos é uma crescente preocupação e pode estar associado a morfologia cocóide viável não-cultivável (VNC) da bactéria, considerada um mecanismo de proteção a condições de estresse e mais resistente a erradicação, e a cavidade oral como um reservatório da bactéria, possivelmente também na forma VNC, mas que pode reativar a infecção gástrica quando engolida (Sharndama; Mba, 2022; Mao *et al.*, 2021; Cellini *et al.*, 1994; Jara *et al.*, 2022).

Para o diagnóstico da infecção, estão disponíveis métodos invasivos e não-invasivos. Os métodos invasivos, baseados em biópsia da mucosa gástrica obtida por endoscopia, incluem análise histopatológica, teste rápido da urease (RUT, do inglês “*rapid urease test*”), cultura e testes moleculares baseado em PCR, utilizados principalmente para identificar mutações que conferem resistência. Os métodos não-invasivos incluem sorologia, pouco útil para identificação da infecção ativa especialmente em países onde a prevalência é alta, teste respiratório da ureia marcada (UBT, do inglês “*urea breath test*”), e o teste de antígeno nas fezes. O padrão-ouro para diagnóstico no Brasil é o exame histopatológico feito a partir de biópsia da mucosa gástrica (Coelho *et al.*, 2018).

Considerando esse cenário, o desenvolvimento de métodos acessíveis, não-invasivos e rápidos como alternativas para diagnóstico da infecção por *H. pylori* torna-se necessário, tanto para diagnóstico *point-of-care* (POC) quanto para triagem de pacientes sintomáticos para posterior referência a exames mais complexos. Nesse sentido, biossensores eletroquímicos apresentam uma solução eficiente para o diagnóstico da infecção em estágios iniciais, de forma sensível e específica, devido a suas características como facilidade de uso, rapidez para obtenção dos resultados,

facilidade de miniaturização e de integração com circuitos eletrônicos, baixo custo e alta sensibilidade (Suni, 2021).

Neste trabalho, foi desenvolvido um biossensor eletroquímico para detecção do antígeno HopQ da bactéria *H. pylori* em amostras artificiais e reais de saliva. O biossensor foi construído a partir de eletrodos de grafite impresso (SPCE, do inglês “*screen-printed carbon electrodes*”) modificados com polipirrol (PPI) e hidróxido de níquel (Ni(OH)_2), utilizados para a imobilização do anticorpo anti-HopQ utilizado. O dispositivo foi caracterizado por imagem e eletroquimicamente e seu desempenho foi analisado em amostras artificiais e reais de saliva. A detecção foi realizada, em todas as etapas, utilizando Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS), visto que é uma das técnicas eletroquímicas mais poderosas para biossensores, já que é capaz de detectar mínimas variações sobre a superfície do biossensor (Hassan *et al.*, 2022).

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Desenvolver um biossensor eletroquímico impedimétrico para detecção da bactéria *H. pylori* em amostras de saliva como alternativa não-invasiva, rápida, de fácil uso e baixo custo para os métodos diagnósticos empregados atualmente.

1.2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver biossensor eletroquímico impedimétrico baseado em SPCE/PPI/ Ni(OH)_2 utilizando anticorpo específico contra o antígeno HopQ para detecção da bactéria *H. pylori*;
- Caracterizar o dispositivo por imagem e técnicas eletroquímicas;
- Produzir curva analítica do método;
- Validar a plataforma em amostras de saliva artificiais e reais pré-caracterizadas.

1.3 JUSTIFICATIVA

A infecção pela bactéria *H. pylori* é a principal causa de gastrite crônica e úlcera peptídica e possui alta prevalência no Brasil, especialmente em regiões de baixas condições socioeconômicas sem acesso a saneamento básico. Apesar de frequentemente ser assintomática, a infecção crônica pode levar ao desenvolvimento de diversas complicações gastrointestinais, inclusive câncer de estômago e linfoma de tecido linfóide associado a mucosa (MALT) (Coelho *et al.*, 2018; Machado-Junior *et al.*, 2021; Camaduro *et al.*, 2014). A transmissão da bactéria ainda não é completamente elucidada, mas a rota oral-oral é considerada uma das principais, na qual a saliva tem um importante papel. A presença da bactéria na cavidade oral, já demonstrada pela literatura científica, apresenta correlação com a infecção gástrica, mas também pode se dar independentemente e pode dificultar a erradicação da infecção após tratamento com antibióticos e favorecer a reinfeção por se tratar de um reservatório para a bactéria (Rasmussen *et al.*, 2012; Kayali *et al.*, 2018).

Atualmente, para o diagnóstico da infecção é considerado padrão-ouro no Brasil o exame histopatológico realizado a partir de biópsia da mucosa gástrica obtida por endoscopia, um teste invasivo, custoso, que necessita de profissionais altamente capacitados, e sedação e jejum do paciente para ser realizado. A outra opção de teste diagnóstico disponibilizado pelo Sistema Único de Saúde (SUS) é o teste sorológico, capaz de detectar anticorpos produzidos pelo paciente após contato com o patógeno, mas que possui pouca utilidade por não ser capaz de diferenciar a infecção ativa de infecções passadas (Coelho *et al.*, 2018; CCATES, 2014).

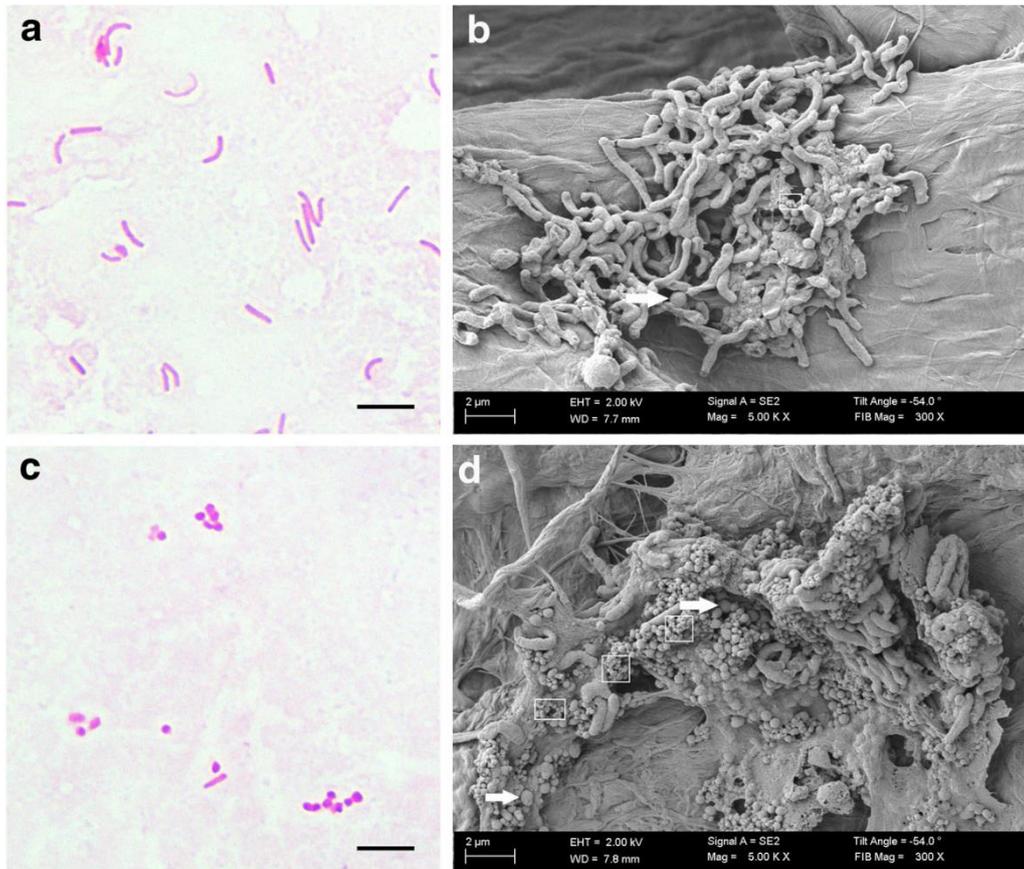
Portanto, torna-se necessário e vantajoso o desenvolvimento de tecnologias diagnósticas para detecção rápida, precoce e não-invasiva da infecção ativa para direcionar o tratamento adequado, referir para exames mais complexos posteriores e também para avaliar a erradicação do microrganismo após a terapia. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um biossensor eletroquímico visando uma detecção não-invasiva, rápida e específica do antígeno HopQ da bactéria *H. pylori* através da saliva, com potencial de superar as desvantagens dos métodos diagnósticos utilizados e oferecer diagnóstico no POC.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 HELICOBACTER PYLORI

Helicobacter pylori é uma bactéria gram-negativa e microaerofílica, capaz de colonizar a mucosa gástrica (Krzyżek, P.; Biernat, M. M.; Gościński, G., 2019), sendo positiva para catalase, oxidase e urease, que ocorre em duas morfologias: em forma de bacilo espiralado, viável e possível de ser cultivado, e em forma cocóide, viável não cultivável (VNC). A forma cocóide aparece em condições subótimas, em cultura ou fisiologicamente, como na presença de antibióticos e inibidores de bomba de próton, sendo considerada mais patogênica e mais resistente (Krzyżek, P.; Biernat, M. M.; Gościński, G., 2019; Sharndama; Mba, 2022). Por microscopia eletrônica observa-se que o bacilo possui de dois a sete flagelos unipolares que permitem a alta motilidade dessa bactéria no muco gástrico (FIGURA 1).

FIGURA 1. (a) Morfologia em bastão da *H. pylori* em microscopia óptica e (b) em microscopia eletrônica de varredura, e (c) morfologia cocóide da *H. pylori* em microscopia óptica e (d) em microscopia eletrônica de varredura.

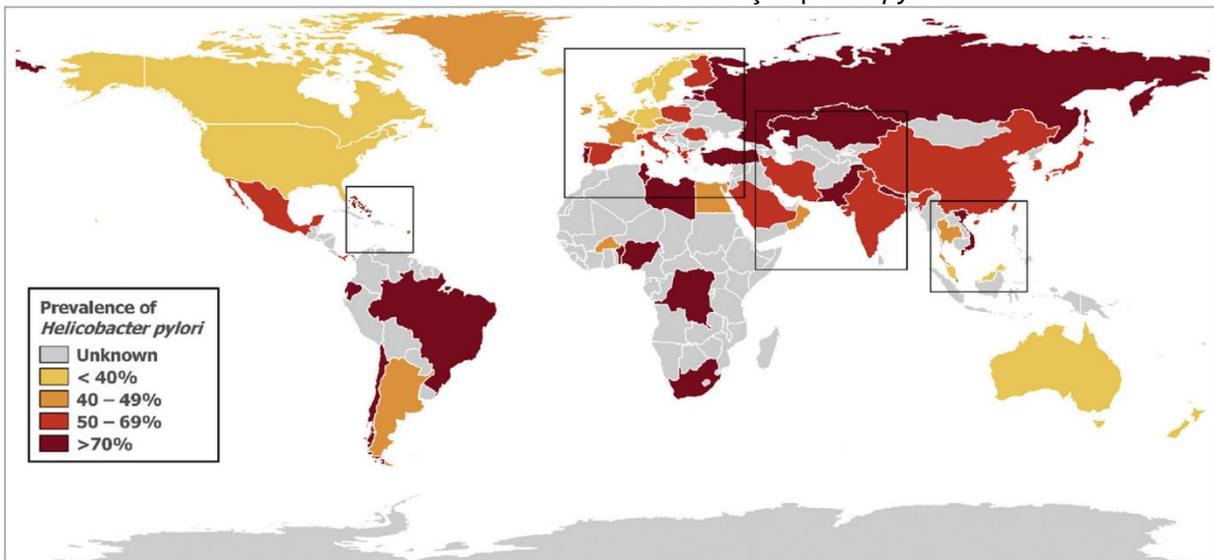


As setas apontam formas cocóides da bactéria e os quadrados indicam vesículas da membrana externa bacteriana. A barra de escala da microscopia óptica é de 5 µm e a da microscopia eletrônica de varredura é de 2 µm. FONTE: KRZYŻEK, P.; BIERNAT, M. M.; GOŚCINIAK, G. (2019).

De acordo com uma revisão sistemática e metanálise publicada em 2017, em 2015 4,4 bilhões de indivíduos estavam infectados por *H. pylori* no mundo inteiro (Hooi et al., 2017). A prevalência chega a ser de mais de 70% em países em desenvolvimento e aproximadamente 30-50% em países desenvolvidos (Sharndama; Mba, 2022; Jara et al., 2022). No Brasil, a prevalência da infecção é reportada como sendo de 71,2% da população, podendo variar de 31,2% na região Sudeste até 90% na região Norte do país (Costa et al., 2021). A qualidade dos dados de prevalência pode variar por razões como tipo de estudo realizado, confiabilidade dos métodos diagnósticos e variações regionais de cada país (Diretrizes da Organização Mundial de Gastroenterologia, 2021). O mapa de prevalência mundial pode ser observado na FIGURA 2. Dados mostram que a prevalência global diminuiu de 50-55% para 43% de 2014 a 2020, devido a melhora de condições de higiene e status econômico, contudo, ainda é uma infecção associada a regiões e países subdesenvolvidos ou em

desenvolvimento como é o caso da América do Sul e do Brasil (Kao *et al.*, 2016). A prevalência é mais alta em adultos do que crianças, contudo a maior parte das infecções (90%) são adquiridas durante a infância e prevalecem até a vida adulta (Malfertheiner *et al.*, 2023; Sharndama; Mba, 2022).

FIGURA 2. Prevalência mundial da infecção por *H. pylori*.

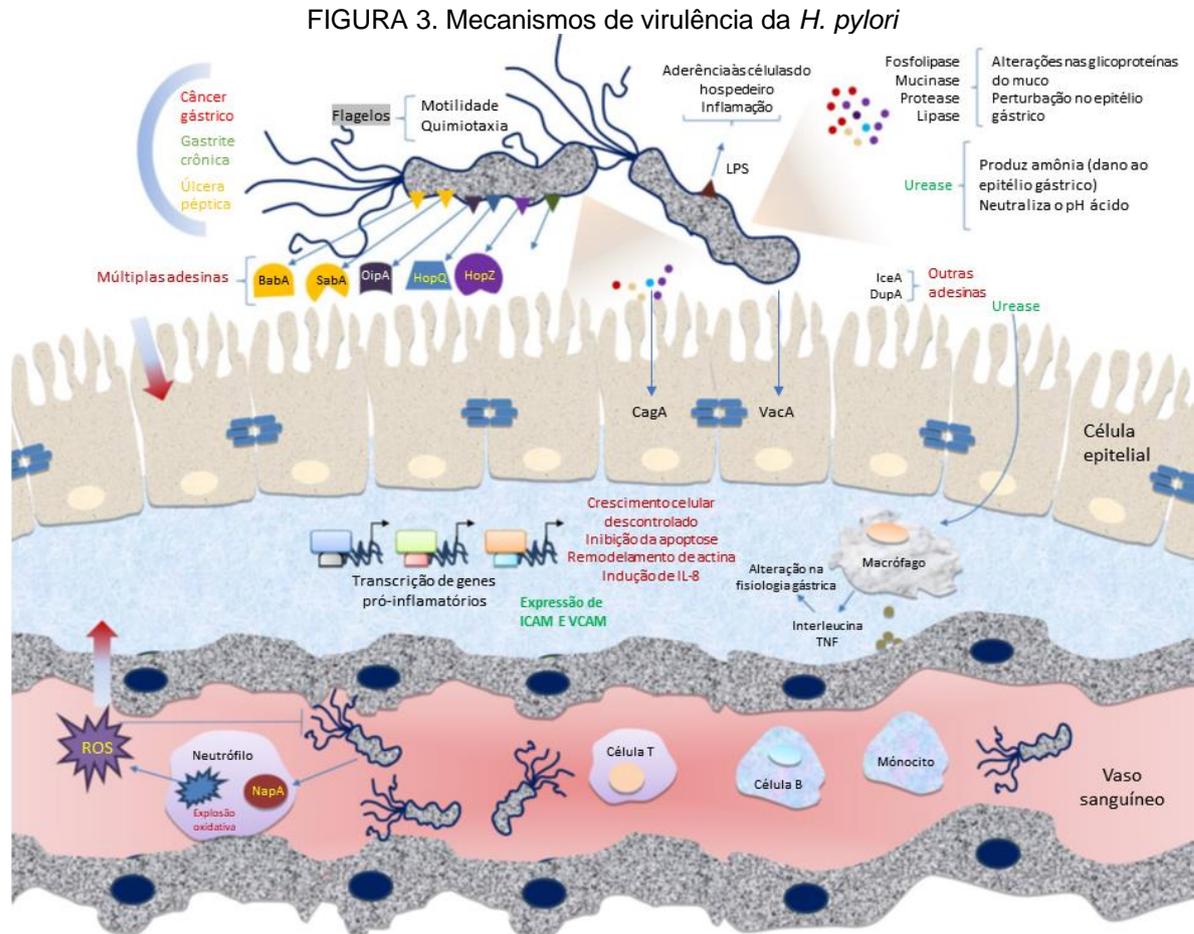


Em vermelho escuro estão os países com alta prevalência da infecção, entre eles o Brasil. Em cinza estão os países sem dados conhecidos sobre a prevalência da infecção. FONTE: Adaptada de Hooi *et al.* (2017).

A *H. pylori* é a principal causa de gastrite crônica e o principal agente etiológico para úlcera péptica e câncer gástrico, sendo considerada um carcinógeno de Grupo 1 (comprovadamente carcinogênico) pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) desde 1994 (IARC, 2012; Hooi *et al.*, 2017). O câncer gástrico é o quarto câncer mais comum do mundo e a quarta causa de morte por câncer no mundo, com mais de um milhão de casos em 2020 (Chiang *et al.*, 2022; Yamaoka, 2010). O processo inflamatório gerado na mucosa gástrica pela bactéria aumenta o risco de desenvolvimento de adenocarcinoma gástrico em até vinte e uma vezes comparado a um indivíduo não infectado. Estima-se que essa infecção seja responsável por 80% dos cânceres gástricos malignos e 5,5% de todos os cânceres (Camaduro *et al.*, 2014; Cardos *et al.*, 2022; CCATES, 2014; Coelho *et al.*, 2018). A infecção por *H. pylori* também está associada com o desenvolvimento de MALT e câncer do trato biliar, além de doenças extra-gástricas como anemia, diabetes mellitus tipo 2 e doenças isquêmicas do coração (Bravo *et al.*, 2018; Sharndama; Mba, 2022; Malfertheiner *et al.*, 2023).

A patogenicidade deste microrganismo depende dos fatores de virulência, das características do hospedeiro, tempo de infecção e de fatores ambientais. Após adentrar o organismo do hospedeiro, a produção de urease pela bactéria é importante para neutralizar o ambiente hostil do estômago no início da infecção. A urease hidrolisa ureia em gás carbônico e amônia, que combinado com a água produz hidróxido de amônio, neutralizando o pH e permitindo sua sobrevivência. Essa atividade é mediada por um canal de ureia que se abre completamente em pH abaixo de 5 e se fecha em pH acima de 7 para impedir a alcalinização letal. Através da motilidade mediada pelos flagelos, a bactéria migra pela camada mucosa até o epitélio gástrico. Duas proteínas principais denominadas FlaA e FlaB compõe o filamento flagelar e são consideradas essenciais para a colonização da mucosa gástrica (Sharndama; Mba, 2022). Então, as adesinas interagem com os receptores celulares fixando o microrganismo e impedindo seu deslocamento por movimentos peristálticos, pelo esvaziamento do estômago, troca da camada mucosa, entre outros, permitindo a colonização e persistência da infecção. Entre essas adesinas estão as proteínas de membrana externa (OMP - do inglês, *outer membrane proteins*) que incluem as proteínas HopQ e HopZ. Outras adesinas que são importantes fatores de virulência são a BabA e a SabA, as mais caracterizadas até o momento, responsáveis por facilitar a colonização, induzir resposta inflamatória da mucosa e favorecer a ação de outros fatores de virulência. Outras conhecidas são a proteína de ativação de neutrófilos (NAP - do inglês, *neutrophil-activating protein*), associada ao desenvolvimento de gastrite crônica por estimular a produção de radicais de oxigênio, a infiltração de neutrófilos e a expressão de citocinas inflamatórias como IL-8 e MIP-1 α , e a proteína inflamatória externa (OipA - do inglês, *outer inflammatory protein*). Após a adesão, a *H. pylori* libera diversas proteínas e toxinas responsáveis por causar dano ao tecido do hospedeiro. Entre as mais estudadas estão: a VacA, cuja ação pode levar a apoptose, resultado de perturbações na mitocôndria da célula do hospedeiro, despolarização da membrana celular, e aumento da susceptibilidade à atividade da urease; e a CagA, que após adentrar a célula do hospedeiro é capaz de perturbar o citoesqueleto e junções célula-célula, estimular sinalização por fator de crescimento e proliferação celular, assim como respostas anti-apoptose. A CagA não está presente em todas as cepas de *H. pylori*, que podem ser divididas em CagA-positiva ou CagA-negativa, sendo que as cepas CagA-positivas são consideradas mais virulentas e causam maior risco de desenvolvimento de câncer gástrico e úlcera péptica

(Camaduro *et al.*, 2014; Sharndama; Mba, 2022; Kao; Sheu; Wu, 2016; Yamaoka, 2010). Um esquema dos mecanismos de alguns fatores de virulência pode ser observado na FIGURA 3.



A patogenicidade da *H. pylori* depende de diversos fatores de virulência, a partir dos quais a bactéria é capaz de se adaptar ao ambiente ácido do estômago, se mover até a mucosa gástrica usando seus flagelos, penetrar a barreira epitelial através da conexão com diferentes receptores celulares e causar dano aos tecidos e inflamação. FONTE: Traduzido e adaptado de Sharndama e Mba (2022).

As rotas de transmissão da infecção ainda não estão completamente elucidadas (Kayali *et al.*, 2018; Diretrizes da Organização Mundial de Gastroenterologia, 2021; Sharndama; Mba, 2022). Contudo, o contato pessoa-pessoa é um fator importante, sendo comum a transmissão de pais para filhos e entre irmãos. A transmissão entre cônjuges ainda é uma controvérsia (Malfertheiner *et al.*, 2023; Gisbert *et al.*, 2002). As vias de transmissão mais prováveis são oral-oral e gastro-oral. A rota fecal-oral parece ser menos provável, pelo menos nos países desenvolvidos, de acordo com as Diretrizes da Organização Mundial de Gastroenterologia de 2021. A transmissão pela via gastro-oral se dá através do

contato com vômito ou suco gástrico. Estudos mostram que é possível encontrar *H. pylori* em grandes quantidades em vômito (Kayali *et al.*, 2018; Brown, 2000). Já pela via oral-oral a hipótese é de que a saliva seja a fonte da infecção pela bactéria, considerando que é possível que o patógeno alcance e colonize a boca pelo vômito e regurgitação. Essa possibilidade emerge o questionamento de se seria possível transmitir a infecção por *H. pylori* através do beijo ou compartilhando uma refeição (Mao *et al.*, 2021). Estudos mostram que é possível amplificar material genético da *H. pylori* diretamente da saliva (Goud *et al.*, 2019; Yamada *et al.*, 2008; Wongsuwanler *et al.*, 2023; Jara *et al.*, 2022), contudo se é possível transmitir a infecção através da saliva ou se a boca pode ser um reservatório para a bactéria, servindo de fonte para reinfecções, ainda é uma controvérsia (Kayali *et al.*, 2018; Mao *et al.*, 2021).

Rasmussen *et al.* (2010) analisaram amostras de biópsia gástrica, de saliva e de placa dentária de 78 pacientes com sintomas de dispepsia utilizando PCR e *Southern Blotting* específicos para o gene 16S rRNA da *H. pylori*. Os resultados foram comparados com o método diagnóstico padrão-ouro. Foi encontrada uma correlação estatisticamente significativa entre a infecção gástrica e a presença da bactéria na cavidade oral ($p < 0,0001$). Em 2012, Rasmussen *et al.* utilizaram os mesmos métodos em amostras de biópsia gástrica, de saliva e de placa dentária de 62 pacientes com sintomas de dispepsia para avaliar os genótipos da bactéria encontrada em diferentes amostras. Novamente foi encontrado uma correlação significativa entre amostras de biópsia gástrica positivas e a presença da bactéria na cavidade oral, e não foi observado diferença significativa nas cepas presentes na saliva e na placa dentária, mas as cepas encontradas no estômago são mais virulentas que aquelas encontradas na cavidade oral. Isso pode indicar a presença de mecanismos adaptativos que permitem que essas cepas colonizem a mucosa gástrica de forma mais rápida e eficiente.

Gebara *et al.* (2006) também utilizaram PCR para o gene 16S rRNA para avaliar a eficácia da terapia tripla para erradicação da *H. pylori* na cavidade oral. PCR e teste rápido da ureia foram usados para determinar a presença de *H. pylori* em amostras de mucosa gástrica e PCR foi utilizada para determinar a presença de *H. pylori* em amostras de saliva, raspado da língua e amostras de placa sub e supragengival antes e depois da terapia tripla. Apenas 10% pacientes obtiveram positividade para *H. pylori* na mucosa gástrica após tratamento, e não foi observada diferença entre a presença da *H. pylori* na cavidade oral antes e depois da terapia, com 60% dos pacientes ainda

positivos. Esses resultados sugerem que a cavidade oral pode ser um reservatório para o microrganismo mesmo após tratamento, podendo inclusive ser um fator de risco para o desenvolvimento da infecção gástrica.

Já Song e Li (2013) empregaram um teste imunocromatográfico para detecção de flagelina e urease em saliva, mas com o objetivo de avaliar a taxa de erradicação após tratamento com terapia tripla associada a tratamento periodontal e enxaguante bucal. Os resultados demonstram que a taxa de erradicação de *H. pylori* gástrica após tratamento odontológico aumentou de 47,6% para 77,3% em comparação com o grupo controle, e que a prevalência de *H. pylori* oral reduziu de 66,7% para 27%, mostrando interessante que tratamentos para cuidado com a higiene da cavidade bucal podem reduzir a *H. pylori* oral e melhorar a taxa de erradicação após tratamento com terapia tripla.

Em concordância com essa conclusão, Yu e colaboradores (2015) também utilizaram um teste rápido (Ameritek) para investigar a correlação entre a presença da *H. pylori* na cavidade oral e fatores epidemiológicos como hábitos de higiene bucal e dieta em 160 pacientes. O estudo demonstrou que histórico familiar de câncer gástrico e placa dentária são fatores de risco para a presença de *H. pylori* oral e bons hábitos de higiene como escovar os dentes duas vezes por dia e lavar as mãos antes de refeições são fatores protetivos.

Alguns autores argumentam que a presença da bactéria na cavidade bucal é apenas transiente, como Al-Ahmad *et al.* (2012), que analisou por PCR a saliva de 15 pacientes positivos para *H. pylori* de acordo com biópsia gástrica, dos quais apenas um foi positivo na saliva. Contudo, isso pode ser devido a presença de inibidores de PCR na saliva, a baixas concentrações da bactéria na saliva ou a bons hábitos de higiene oral, considerado um fator protetivo para a presença da bactéria na cavidade oral (Bangpanwimon *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2023b). Ainda, alguns autores consideram que ainda não foi demonstrado que é possível cultivar a bactéria a partir de amostras da cavidade oral por não ter sido depositado em coleções nacionais de cultura a sequência genômica da cepa cultivada e por baixas taxas de positividade em cultura (Mao *et al.*, 2021). Isso pode ser justificado pela capacidade da bactéria de se transformar da morfologia espiralada para a morfologia cocóide, que não é capaz de ser cultivada em condições de estresse e da dificuldade da cultura desse microrganismo, que pode ser afetada pela forma de coleta e transporte da amostra, por exemplo (Sharndama; Mba, 2022; Cardos *et al.*, 2022). Ademais, em um estudo

de 1994, Cellini *et al.* observaram formas bacilares viáveis de *H. pylori* no estômago após inoculação por gavagem da forma cocóide VNC da bactéria em ratos. Isso pode indicar que a dificuldade do cultivo da bactéria pode ser devido à presença da forma cocóide na cavidade oral, mas que essa pode ser reativada para infecção quando atinge o estômago (Cellini *et al.*, 1994; Mao *et al.*, 2021).

Recorrência da bactéria pode ocorrer por reaparecimento ou por reinfecção. Reaparecimento se trata da mesma cepa da bactéria que foi apenas temporariamente suprimida ao invés de erradicada, e acontece entre 3 e 12 meses. Reinfecção se trata da mesma ou outra cepa da bactéria após erradicação bem-sucedida da infecção original, geralmente em um período maior que um ano após a cura. A taxa de reinfecção em adultos varia de 0 a 23,4%. A transmissão intrafamiliar entre indivíduos assintomáticos pode estar envolvida no processo de reinfecção (Kayali *et al.*, 2018). Estudos mostram que estratégias de diagnóstico e tratamento de famílias podem ser mais eficazes em diminuir as taxas de reaparecimento que estratégias individuais (Malfertheiner *et al.*, 2023). Ademais, existem evidências que demonstram que pacientes com presença da *H. pylori* na cavidade oral tem maior risco de apresentarem reinfecção gástrica após terapia de erradicação bem-sucedida (Rasmussen *et al.*, 2012).

Como primeira linha de tratamento da infecção é recomendado pelo IV Consenso Brasileiro sobre Infecção por *Helicobacter pylori* a terapia tripla, ou seja, a associação de um inibidor de bomba de prótons, amoxicilina e claritromicina por 14 dias. A taxa de erradicação da bactéria para esse regime é de 81,9%, e essa taxa vem diminuindo com o aumento da resistência a antibióticos. Inclusive, a principal causa das falhas terapêuticas é a resistência à claritromicina, e nesses casos a alternativa para tratamento é a terapia tripla com levofloxacina ou terapia quádrupla com bismuto. Contudo, o aumento das taxas de resistência à quinolonas também passou a ser uma preocupação e estudos brasileiros mostram que a taxa de resistência a fluoroquinolonas é de 13,4%. Após uma terceira falha terapêutica, é necessário a realização de testes de susceptibilidade a antimicrobianos (Coelho *et al.*, 2018; Song; Li, 2013).

2.2 DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO

De acordo com Camaduro *et al.* (2014) 85% dos indivíduos infectados por *H. pylori* permanecem assintomáticos, enquanto aproximadamente 1% desenvolve câncer gástrico e 10% desenvolvem úlcera péptica. A apresentação clínica em adultos inclui hipocloridria, dor epigástrica, e sintomas dispépticos moderados a severos (Malfertheiner *et al.*, 2023). A testagem para infecção por *H. pylori* deve ser realizada somente quando há intenção de se providenciar tratamento e é indicada para pacientes que apresentam linfoma MALT de baixo grau, úlcera gastroduodenal, dispepsia em pacientes com menos de 60 anos, anemia por deficiência de ferro sem causa aparente, entre outros. A escolha do método diagnóstico apropriado varia de acordo com faixa etária e quadro clínico do paciente (CCATES, 2014).

Os métodos diagnósticos são divididos em invasivos, baseados em endoscopia, e não-invasivos. Os invasivos são realizados a partir de biópsia da mucosa gástrica e incluem análise histopatológica do tecido, cultura, teste rápido da urease e testes moleculares baseados em PCR. Os não-invasivos incluem o teste de antígeno nas fezes, o teste respiratório com ureia marcada com C¹³ ou teste do sopro, e o teste sorológico para detecção de anticorpos, dos quais apenas o último está disponível no SUS, mas possui utilidade limitada para diagnóstico da infecção ativa visto que anticorpos podem estar presentes até 12 meses após erradicação da infecção (Azad *et al.*, 2022, CCATES, 2014; Cardos *et al.*, 2022). No caso de pacientes com menos de 60 anos e dispepsia sem sintomas alarmantes, é recomendado por diretrizes nacionais e internacionais o uso de testes não-invasivos (Chey *et al.*, 2017; Coelho *et al.*, 2018).

Para o teste respiratório com ureia marcada (UBT, do inglês “*urea breath test*”), amostras respiratórias são coletadas do paciente em sacos ou tubos antes e depois da ingestão de uma solução de água com ureia marcada com C¹³. O paciente deve estar em jejum por pelo menos seis horas e deve interromper o tratamento com sais de bismuto, inibidores de bomba de prótons e antibióticos para evitar falsos-negativos. Se o paciente apresentar a infecção por *H. pylori*, a urease da bactéria irá converter a ureia em dióxido de carbono marcado, exalado na respiração. A dosagem é feita em laboratório usando espectrometria de massa. Já o teste de antígeno nas fezes é realizado a partir de uma pequena amostra de fezes diluída e a detecção do antígeno pode ser pelo método de ELISA ou por teste rápido do tipo ensaio de fluxo lateral, usando anticorpos anti-*H. pylori*. Os testes sorológicos também são realizados por ELISA, contudo não são capazes de distinguir infecção passada de uma infecção

ativa, por isso não são utilizados para diagnóstico nem para avaliar a erradicação da bactéria após tratamento, mas são indicados para estudos epidemiológicos (Coelho *et al.*, 2018).

Os testes invasivos são todos realizados a partir de endoscopia digestiva, um exame de imagem que requer sedação e jejum do paciente, além de ser caro, demandar tempo e profissionais qualificados (Saxena; Chauhan; Jain, 2021; Coelho *et al.*, 2018; Nosrati *et al.*, 2017; Machado-Júnior *et al.*, 2021). Durante esse procedimento, são feitas biópsias da mucosa gástrica, que podem ser utilizadas em diferentes métodos diagnósticos. Entre eles, a análise histopatológica é considerada padrão-ouro para detecção da infecção. Empregando coloração hematoxilina e eosina (H&E) é possível observar em casos de gastrite crônica a presença de neutrófilos intraepiteliais, células mononucleares e agregados linfóides. Nessa coloração também é possível observar bacilos espiralados sobre o epitélio, na camada mucosa e nas glândulas gástricas (Azad *et al.*, 2022). Colorações especiais como Giemsa podem melhorar a sensibilidade do método, assim como o uso de imunohistoquímica. A acurácia do diagnóstico é influenciada pela experiência do patologista realizando a análise, uso de medicamentos, assim como local e tamanho da biópsia realizada, entre outros fatores (Cardos *et al.*, 2022).

O teste rápido da urease (RUT, do inglês “*rapid urease test*”), simples e barato, detecta indiretamente a presença da bactéria em amostras de biópsia. A amostra deve ser adicionada e incubada em um meio contendo ureia e um indicador de pH. A urease da *H. pylori* produz amônia a partir da ureia, tornando o pH alcalino e gerando uma mudança de cor do indicador de pH. O tempo de incubação da amostra até o resultado varia de 5 minutos a 24 horas dependendo do teste utilizado, visto que existem diversas opções disponíveis comercialmente. O seu uso em amostras da cavidade bucal não é recomendado dado a possibilidade da presença de outras bactérias que expressam urease (Jara *et al.*, 2022; Cardos *et al.*, 2022; Azad *et al.*, 2022).

A cultura geralmente é realizada quando há necessidade de se realizar teste de susceptibilidade a antibióticos devido a falha no tratamento com antimicrobianos. É altamente específica, contudo, é um processo complexo, pois depende de fatores como qualidade da coleta e transporte da amostra, e pode demorar em torno de sete dias até o resultado (Cardos *et al.*, 2022).

Testes moleculares baseados em PCR são realizados principalmente para detecção da infecção e de mutações causadoras de resistência a antibióticos. É

comumente realizado em amostras de biópsia gástrica ou suco gástrico, mas também pode ser realizado em outros tipos de amostra, como fezes e saliva (Rimbara; Sasatsu; Graham, 2012). Os principais genes alvo utilizados são 23S rRNA, que pode apresentar mutações que conferem resistência à claritromicina, 16S rRNA, e *glmM*. O tempo estimado até o resultado é de 3 horas e 45 minutos. As vantagens do uso de métodos moleculares são a capacidade de detectar a bactéria em todas as suas formas, inclusive na forma cocóide VNC, e é capaz de superar as desvantagens da cultura, contudo por enquanto não existem ensaios aprovados pela FDA (Food & Drug Administration) (Cardos *et al.*, 2022; Azad *et al.*, 2022; Chey *et al.*, 2017).

Os valores de sensibilidade e especificidade de cada método descrito estão disponíveis na TABELA 1.

TABELA 1. Sensibilidade e especificidade de métodos diagnósticos para infecção por *H. pylori*.

Método	Sensibilidade	Especificidade	Invasivo	Interrupção do tratamento	Disponível no SUS
Sorologia	85%	79%	Não	Não	Sim
Teste respiratório com ureia marcada	96%	95%	Não	Sim	Não
Teste de antígeno nas fezes	94%	97%	Não	Sim	Não
Histologia	93-96%	98-99%	Sim	Sim	Sim
Teste rápido da urease	≥90%	95%	Sim	Sim	Não
Cultura	80%	100%	Sim	Sim	Sim
Testes moleculares (PCR)	*	*	*	*	Não

Fonte: O autor (2023).

NOTA: *Sensibilidade e especificidade variam conforme primers e gene-alvo utilizados, assim como o fato de ser invasivo ou não depende do tipo de amostra utilizada.

Após tratamento, é necessário realizar o rastreamento da infecção por teste diagnóstico após um período mínimo de quatro semanas para confirmar a erradicação da bactéria. O teste respiratório de ureia marcada e o teste de antígeno nas fezes são os métodos recomendados pelo IV Consenso Brasileiro sobre infecção por *H. pylori* e internacionalmente, contudo a disponibilidade desses testes ainda é limitada no Brasil, portanto a histologia é o método utilizado (Coelho *et al.*, 2018; Malfertheiner *et al.*, 2023; CCATES, 2014).

Nesse contexto, o uso de amostras com possibilidade de coleta não-invasiva se torna interessante, principalmente a saliva, que é possível de ser coletada de forma indolor, rápida e por autocoleta, apresentando grande potencial para a aplicação no diagnóstico *point-of-care* (Genelhoud *et al.*, 2022; Salu *et al.*, 2022; Jara *et al.*, 2022). Evidências mostram que o uso de saliva é mais vantajoso que amostras de fezes, que necessitam de procedimentos complexos para preparação da amostra, diferentemente da saliva, e também que a correlação entre infecção gástrica e a presença de *H. pylori* oral é maior que a correlação com testes de antígeno em fezes, além da coleta mais fácil e conveniente (Rimbara; Sasatsu; Graham, 2012; Yee *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2023b). Além disso, é uma amostra mais conveniente e acessível para coleta em crianças e adultos incapazes (Jaradat *et al.*, 2023). Portanto, a saliva pode ser uma amostra confiável, eficiente, e de implementação mais rápida e barata que endoscopia, para o diagnóstico não-invasivo da infecção por *H. pylori*, para triagem para exames mais complexos e para acompanhamento da erradicação após tratamento (Jara *et al.*, 2022; Jaradat *et al.*, 2023; Yang *et al.*, 2015; Yee *et al.*, 2013).

2.3 BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS

Biossensores eletroquímicos são dispositivos analíticos capazes de transformar um evento biológico em um sinal mensurável através de um transdutor. Possuem dois elementos essenciais, o biorreceptor e o transdutor. Biorreceptores são biomoléculas específicas para o analito de interesse e o transdutor, no caso de biossensores eletroquímicos, trata-se de um eletrodo de trabalho. O sinal obtido pelo transdutor será proporcional à concentração do analito de interesse na amostra analisada (Bhalla *et al.*, 2016; Cesewski; Johnson, 2020; Hassan, 2022). Biossensores eletroquímicos apresentam vantagens em relação a outros biossensores, como a rapidez para obtenção de resultado, facilidade de uso, de miniaturizar e de integrar

com circuitos eletrônicos, o baixo custo e a alta sensibilidade de detecção (Suni, 2021).

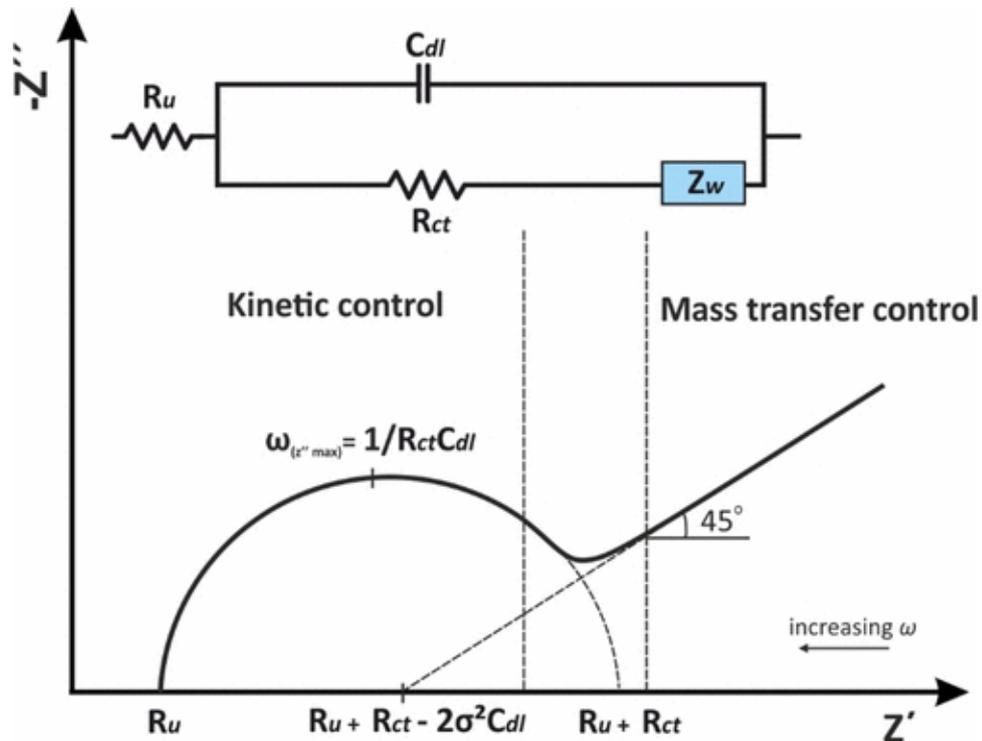
A especificidade, sensibilidade e reprodutibilidade de um biossensor depende do biorreceptor escolhido e da forma como ele será imobilizado no eletrodo. Importante destacar que a sua estrutura e função biológica devem ser preservadas durante o funcionamento do dispositivo (Hassan, 2022). Anticorpos são frequentemente empregados e são altamente específicos, mesmo apesar de suas desvantagens, que incluem alto custo e sensibilidade a variações de temperatura e pH. Ácidos nucleicos também são empregados como biorreceptores e podem se hibridizar especificamente com a sequência de material genético selecionada como alvo. Entre os biorreceptores mais modernos estão os aptâmeros, oligonucleotídeos de fita-simples capazes de detectar diferentes analitos como proteínas, íons metálicos e até alvos mais complexos como células inteiras, contudo o custo de produção ainda é um obstáculo; também os polímeros molecularmente impressos (MIPs, do inglês "*molecularly imprinted polymers*"), que são receptores sintéticos formados a partir de uma matriz polimérica sintetizada ao redor do alvo desejado; e os fragmentos de cadeias pesadas de anticorpos ou VHHs, também conhecidos como nanobodies, que são derivados de anticorpos de cadeia pesada de camelídeos e produzidos por engenharia de proteínas (Morales; Halpern, 2018; Salvador; Vilaplana; Marco, 2019; Santos *et al*, 2023; Thaler; Luppa, 2019).

A imobilização dos biorreceptores pode ser feita de forma aleatória ou orientada e de forma irreversível ou reversível. Entre as principais estratégias está, por exemplo, a imobilização por adsorção, que é reversível e aleatória e se utiliza de ligações de hidrogênio, forças de van der Waals e interações hidrofóbicas. É considerada um método fácil, mas a ligação é fraca e os biorreceptores podem se desconectar, levando a problemas de reprodutibilidade. Já a imobilização por ligação covalente é irreversível e pode utilizar de diferentes grupos químicos, como aminas e ácidos carboxílicos, que geralmente estão disponíveis na estrutura dos biorreceptores, para imobilizá-los de forma aleatória. A imobilização por bioafinidade usa biomoléculas complementares, como o par biotina e avidina, para garantir uma retenção reversível dos biorreceptores, que geralmente são modificados para conter um dos elementos do par biológico. O uso da proteína A, derivada de bactérias e que possui afinidade pela porção Fc de anticorpos de mamíferos, também é um exemplo de imobilização por afinidade comumente usada. A imobilização por ligação a metais também é

explorada em biossensores eletroquímicos, como no caso de biorreceptores contendo cauda de histidina, que podem ser imobilizados de forma orientada em transdutores contendo metais de transição, como níquel e cobre. É importante ressaltar que a imobilização orientada é mais vantajosa, pois aumenta a sensibilidade e diminui a concentração de biorreceptor necessária, pois favorece a exposição dos sítios de ligação (Liébana; Drago, 2016; Santos *et al.*, 2023).

Diferentes técnicas eletroquímicas, como impedância, voltametria, potenciometria, entre outras, com diferentes características podem ser aplicadas a biossensores como métodos de detecção. Entre essas, a Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS) é considerada a técnica mais poderosa para aplicação em biossensores, pois é capaz de detectar sutis variações sobre a superfície do transdutor, inclusive interações de espécies isolantes, e é menos destrutiva que outras técnicas eletroquímicas (Hryniewicz, 2022). A impedância representa a oposição de um circuito elétrico à passagem de elétrons em um circuito de corrente alternada, sendo medida em ohms (Ω). Os dados de EIS são representados em um gráfico de impedância imaginária (eixo Y) por impedância real (eixo X) chamado de diagrama de Nyquist. A partir desses dados, é possível analisar diversos parâmetros e estudar os processos elétricos, eletroquímicos e físicos acontecendo no sistema, mas no campo de biossensores o parâmetro mais utilizado é a resistência de transferência de cargas (R_{ct}). A variação do R_{ct} acontece devido aos processos de transferência de carga que se dão entre o eletrodo e o eletrólito e é afetado, portanto, pela presença de materiais isolantes como biomoléculas, que dificultam esse processo de transferência (Hassan, 2022; Antiochia, 2022; Hryniewicz, 2022; Lazanas; Prodromidis, 2023; Magar; Hassan; Mulchandani, 2021). O Diagrama de Nyquist (FIGURA 4) é construído por valores de impedância imaginária ($-Z''$) no eixo Y e valores de impedância reais no eixo X (Z'). Os valores são representados em Ohm. O valor de R_{ct} é obtido do eixo X e pode ser observado no gráfico como o diâmetro do semicírculo. Os outros elementos representados não serão abordados neste trabalho.

FIGURA 4. Diagrama de Nyquist exemplificando uma simulação de EIS e seus principais componentes.



Eixo Y: impedância imaginária ($-Z''$); Eixo X: impedância real (Z'). Fonte: Lazanias; Prodromidis (2023).

A modificação de eletrodos com diversos materiais é aplicada em biossensores eletroquímicos para aumentar a sensibilidade, biocompatibilidade, condutividade elétrica e para facilitar e melhorar a imobilização de biomoléculas na plataforma. Nesse sentido, nanomateriais são extensamente usados na construção de biossensores por suas propriedades como alta razão superfície-volume, morfologia adaptável, facilidade de miniaturização e condutibilidade aprimorada da interface (Kurbanoglu *et al.*, 2016; Ronkainen *et al.*, 2010). A miniaturização é um fator benéfico, pois permite o uso de volumes menores de amostra, o que reduz o custo dos testes (Bhalla *et al.*, 2016). Destaca-se para aplicação de materiais de carbono, como nanotubos de carbono e grafeno, por sua alta condutividade elétrica, biocompatibilidade e área de superfície. Ademais, metais e óxidos de metais são utilizados por facilitarem os processos de transferência de cargas e para imobilização de biorreceptores (Hassan, 2022). Também são vantajosos para o emprego em biossensores eletroquímicos os polímeros condutores (CPs), que são de natureza orgânica, mas eletricamente condutores. Esses são facilmente funcionalizados com grupamentos, como aminas e ácidos carboxílicos, que frequentemente servem para

imobilizar biomoléculas, além de serem biocompatíveis (Aydemir; Malmström; Travas-Sejdic, 2016; Hryniewicz *et al.*, 2022). Seu uso, por amplificar as medidas eletroquímicas, aumenta a sensibilidade dos biossensores, que alcançam, portanto, baixos limites de detecção (Hassan, 2022).

Atualmente, biossensores eletroquímicos para detecção da *H. pylori* em amostras da cavidade oral, apesar de apresentarem diversas vantagens sobre outras técnicas diagnósticas, são escassos na literatura. Entre eles, o trabalho desenvolvido por Mannoor *et al.* (2012), citado por 958 pessoas até o presente momento, é de grande relevância. Foi desenvolvido um biossensor a partir da deposição de grafeno em fibroína de seda acoplado a uma bobina ressonante, obtendo-se a partir da combinação desses materiais um dispositivo biocompatível que opera sem bateria e permite a detecção remota do analito. O grafeno foi funcionalizado com peptídeos antimicrobianos como biorreceptores específicos contra a *H. pylori*. O biossensor foi idealizado para ser usado sobre o esmalte dentário, onde fica em contato com a saliva. A ligação do biorreceptor com as células bacterianas leva ao aumento da resistência, que é monitorado remotamente por um dispositivo leitor de rádio frequência. O dispositivo foi testado em solução de saliva humana contendo células de *H. pylori*, e foi possível observar o aumento da resistência do grafeno em tempo real. O limite de detecção foi dado como 100 células.

Chen *et al.* (2018) desenvolveu um biossensor eletroquímico de DNA, empregando DNA em estrutura *hairpin* modificado com nanopartículas de ouro e um complexo de rutênio conhecido como RuL como indicador eletroativo de hibridização de DNA, para detecção do gene *ureB* da *H. pylori* em amostras de placa dentária de 34 pacientes. A detecção foi realizada por voltametria de pulso diferencial (DPV, do inglês “*differential pulse voltammetry*”) e os resultados foram comparados com UBT. Foram obtidas sensibilidade de 100% e especificidade de 97% e o método obteve um LOD de 12 fM.

Semelhantemente ao dispositivo desenvolvido neste trabalho, Jaradat *et al.* (2023) desenvolveu um biossensor a partir de SPCEs modificados com nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNTs, do inglês “*multi-walled carbonnanotubes*”) decorados com nanopartículas de ouro. Anticorpos anti-HopQ são imobilizados sobre a estrutura do eletrodo a partir da ligação covalente entre grupamentos amina na estrutura da biomolécula e grupamentos carboxílicos disponíveis nos MWCNTs, auxiliado pela via EDC:NHS. O biossensor foi incubado com a proteína-alvo por 15

minutos antes da detecção, obtida por voltametria de onda quadrada (SWV, do inglês “*square wave voltammetry*”). O desempenho do biossensor foi avaliado em amostras de saliva artificial adicionadas da proteína HopQ obtida comercialmente. O LOD obtido foi de 2 pg/mL e o limite de quantificação (LOQ) foi de 8,6 pg/mL.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 BIOSSENSOR

3.1.1 MODIFICAÇÃO DOS ELETRODOS

A plataforma inicial utilizada foi um eletrodo impresso de grafite descartável (SPE - do inglês, *screen-printed electrode*) contendo um eletrodo de trabalho, um contraeletrodo de carbono e um eletrodo de referência de prata (cat no. DRP-110, MetrOhm, Brasil). A eletropolimerização do polímero condutor polipirrol (PPI) foi executada conforme Hryniewicz *et al.* (2019), submergindo os eletrodos de grafite impresso em solução de monômeros de pirrol a 100 mmol/L (98%, Sigma Aldrich) com solução template de alaranjado de metila (Synth) a 5 mmol/L, para polimerização na morfologia de nanotubos (NTs), e 8 mmol/L de KNO_3 (Sigma Aldrich) como meio eletrolítico. O pH final foi ajustado para 2 a 25°C adicionando HNO_3 (Synth) a 1 mol/L. A eletropolimerização foi realizada aplicando potencial de 0,8 V e carga controlada de 500 mC/cm² para garantir a deposição da mesma quantidade de PPI-NTs em todos os eletrodos. A eletrodeposição de hidróxido de níquel foi executada utilizando a técnica eletroquímica de voltametria cíclica (VC), como descrito em Rahmati *et al.*, (2021). Os eletrodos já modificados com PPI-NTs foram submersos em béquer contendo 10mL de solução 0,01 mol/L de $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ (Sigma Aldrich), então foi realizada a deposição de $\text{Ni}(\text{OH})_2$ aplicando voltametria cíclica, com variação de potencial de 0 a -1,5V por 20 ciclos com taxa de varredura de 50 mV/s. A estabilização dos materiais foi atingida em seguida pela aplicação de VC com potencial de -0,5V a 0,5V em uma taxa de varredura de 20 mV/s por 4 ciclos em tampão fosfato-salino (PBS, pastilha pH 7,4, Synth).

Para caracterização eletroquímica dos eletrodos modificados com PPI-NTs/ $\text{Ni}(\text{OH})_2$ foram utilizadas EIS e VC. Todos os experimentos foram realizados em tampão fosfato-salino (PBS). Os dados de EIS foram obtidos aplicando uma voltagem alternada de 10 mV em circuito de potencial aberto em uma faixa de frequência de 10kHz a 0,1 Hz. Os parâmetros utilizados para VC foram os mesmos utilizados para estabilização do material. Os eletrodos também foram caracterizados por imagem por

microscopia eletrônica de varredura (MEV) em um TESCAN MIRA3. As imagens de MEV foram obtidas pelo Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da UFPR.

Todas as medidas e procedimentos eletroquímicos foram realizados no potenciostato Autolab PGSTAT 20 e no potenciostato portátil Metrohm DropSens STAT-I-400. Os dados de EIS obtidos foram ajustados de acordo com um circuito equivalente contendo linha de transmissão.

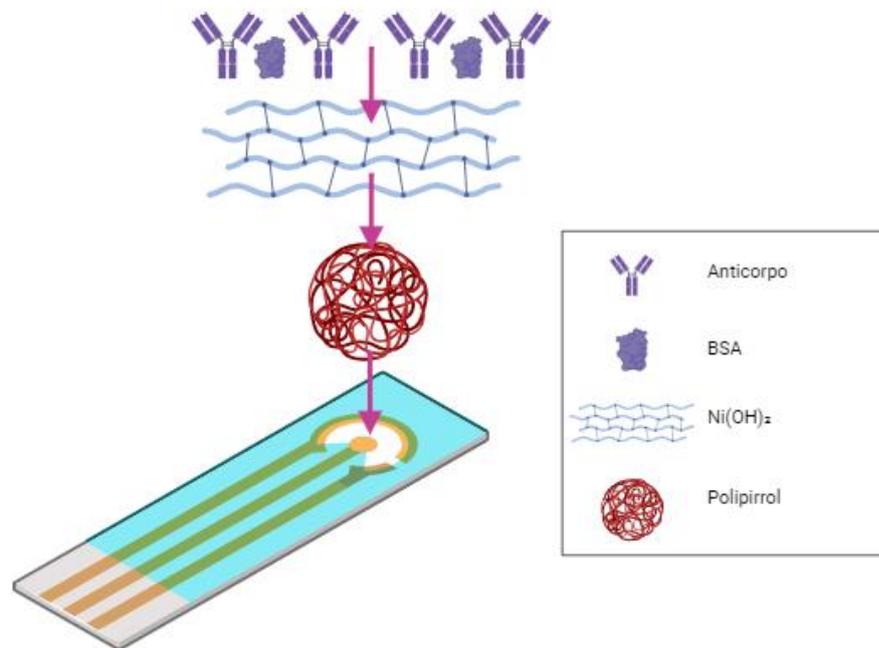
3.1.2 CONSTRUÇÃO DO BIOSENSOR

A imobilização dos anticorpos foi realizada através de ligação covalente dos grupamentos amina das biomoléculas com o Ni(OH)_2 . Sobre o eletrodo de trabalho modificado foram depositados 15 μL de solução de anticorpos anti-HopQ (cat no. MBS541826, Biotrend, Alemanha) diluído até a concentração de 500 ng/mL em PBS e incubado por 45 minutos. Sítios de ligação inespecíficos foram bloqueados com 15 μL de solução de BSA a 1% por 30 minutos. Após isso, o eletrodo modificado foi lavado por 10 minutos com PBS para remover as biomoléculas não ligadas, como descrito em Hryniewicz *et al.* (2022). Por fim, os biossensores estavam prontos para serem utilizados para detecção da proteína-alvo HopQ comercial produzida especialmente para este trabalho (Biotrend, Alemanha) em saliva artificial ou amostras de saliva de pacientes, obtidas do serviço de detecção de SARS-CoV-2 do Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade da Universidade Federal do Paraná.

O passo-a-passo da construção do biossensor foi caracterizado por EIS nos parâmetros apresentados no item 3.2.

Um esquema representando a construção do biossensor pode ser observado na FIGURA 5.

FIGURA 5. Esquema da construção do biossensor.



O biossensor é construído a partir de um eletrodo de grafite impresso, representado em azul, modificado com nanotubos de polipirrol e hidróxido de níquel (Ni(OH)₂). O anticorpo é imobilizado sobre o material e o bloqueio de sítios de ligação inespecíficos é feito com BSA. FONTE: O autor (2023).

3.2 AVALIAÇÃO DO BIOSSENSOR

3.2.1. DETECÇÃO DA PROTEÍNA-ALVO

Para avaliar a capacidade do anticorpo de detectar a proteína-alvo HopQ, os biossensores foram submetidos a diferentes concentrações da proteína comercial (Biotrend, Alemanha) diluída em saliva artificial (Sigma Aldrich). A faixa linear de concentrações testada foi de 0,5 pg/mL a 3,3 ng/mL. Para detecção, primeiramente foi realizada uma leitura de EIS para obtenção do branco. Depois, 15 µL da solução de HopQ em saliva artificial foi adicionada sobre o eletrodo de trabalho e incubada por 15 minutos. Foi feita a lavagem do eletrodo com PBS por 5 minutos e então feita a medição da resposta por EIS.

3.2.2 Detecção em amostras de saliva

3.2.2.1 Caracterização das amostras de saliva

O uso das amostras de saliva foi aprovado pelo Comitê de Ética do Setor de Ciências Biológicas da UFPR (CAEE: 43945121.4.0000.0102). As amostras de sangue são de voluntários que também doaram amostras de saliva e seu uso foi aprovado pelo mesmo Comitê de Ética sob o mesmo código.

Amostras de saliva foram coletadas no serviço de detecção de SARS-CoV-2 do Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade da Universidade Federal do Paraná e submetidas a RT-qPCR para detecção de ácidos nucleicos SARS-CoV-2. As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas brevemente e 100µL do sobrenadante foram usados para extração de RNA magnética automatizada usando o EXTRACTA-RNA e o kit de DNA viral (Loccus Biotecnologia, Brasil) de acordo com as instruções do fabricante. 5µL das amostras extraídas foram misturados com 15 µL da mistura de reação providenciada no Kit BIOMOL OneStep/COVID-19 (IBMP, Brasil) e adicionadas a uma placa de PCR de 96 poços para análise usando o QuantiStudio5™ (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA).

Nove (9) amostras de saliva previamente caracterizadas como negativas para SARS-CoV-2 foram submetidas a detecção de ácidos nucleicos de *H. pylori* por RT-qPCR em duplicata. Foram utilizados o primer *forward* GCACAAGCGGTGGAG, o primer *reverse* CTCTCAATGTCAAGCCTAGG e a *probe* FAM-TGGTTTAATTCGAAGATACACGAAGA-MGB (Eurofins Genomics, Alemanha), descrito em Zhao *et al.* (2022) para amplificação do gene 16S rRNA da bactéria. Foram utilizados primers para a proteína RNase P como controle interno da reação (ABY-QSY). Foram utilizados 5 µL de amostra extraída conforme o protocolo utilizado para SARS-CoV-2 misturado a 15 µL de mistura de reação, preparada com o kit de mistura de reação para qPCR (Promega, Brasil) conforme instruções do fabricante e com os primers e sonda desenhados para *H. pylori* a 0,5 µmol/L e 0,125 µmol/L, respectivamente. Esse volume foi então adicionado à placa de PCR de 96 poços. O QuantiStudio5™ (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) foi utilizado para análise. Os parâmetros utilizados foram: início da desnaturação a 95°C por 3 minutos, 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento a 55°C por 40 segundos, e um ciclo para resfriamento a 25°C por 10 segundos. Para a repetição do experimento, a temperatura de anelamento foi aumentada para 60°C.

Foram utilizadas três amostras de saliva e duas amostras de sangue para realizar reação de PCR convencional utilizando os mesmos primers para *H. pylori*, sem controle interno e com água ultrapura como controle negativo. Dois (2) µL de

amostra com ácidos nucleicos extraídos como descrito acima foram misturados a 28 µL de mistura de reação contendo primers e mistura de PCR (IBMP, Brasil). O termociclador utilizado foi Bio-Rad T100 Thermal Cycler e os parâmetros utilizados foram desnaturação a 95°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 60°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 30 segundos, por fim um ciclo de resfriamento a 16°C. Em seguida, foi realizada uma corrida eletroforética em gel de agarose a 1,5% corado com Gel Red (Biotium) a 100V por 45 minutos com os produtos amplificados. A fotodocumentação do gel de eletroforese foi realizada no Axygen Gel Documentation System.

Também foi realizado sequenciamento de Sanger dos produtos da PCR convencional com o kit Big Dye Terminator (Thermo Fisher Scientific, Brasil). Primeiro, os produtos de PCR a serem sequenciados foram purificados por ExoSAP-IT (Thermo Fisher Scientific, Brasil) conforme instruções do fabricante. Em seguida, as amostras purificadas foram submetidas a reação Big Dye conforme as instruções do fabricante para o kit de sequenciamento. Então, foi feita a precipitação por etanol absoluto, EDTA e etanol 70% e ressuspensão em água ultrapura. As sequências foram obtidas usando o equipamento Applied Biosystems 3500 DNA Analyzer. O sequenciamento de Sanger foi realizado em laboratório do Departamento de Bioquímica da UFPR.

PCR *in silico* foi realizada utilizando a plataforma insilico.ehu.eus (Bikandi *et al.*, 2004). O primer-BLAST foi realizado com a ferramenta da plataforma online do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) a partir da sequência genômica para o gene 16S rRNA da bactéria *Helicobacter pylori*, cepa HBP14, registrada no GenBank como LT799736.1. BLAST das sequências obtidas pelo Sequenciamento de Sanger também foi realizada utilizando a plataforma do NCBI (Ye *et al.*, 2012).

3.2.2.2 Detecção em amostras previamente caracterizadas

Seis amostras de saliva previamente caracterizadas como negativas para SARS-CoV-2 obtidas do serviço de detecção de SARS-CoV-2 do Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade da UFPR foram utilizadas. As amostras foram diluídas em PBS (fator de diluição 1:100) e 15 µL de cada amostra foi adicionada ao eletrodo trabalho de um biossensor após a medição do branco. As amostras foram incubadas por 15 minutos e então os eletrodos foram lavados com PBS por 5 minutos. Então, foi feita a medida de EIS. Na mesma amostra diluída foi feita a adição de 200

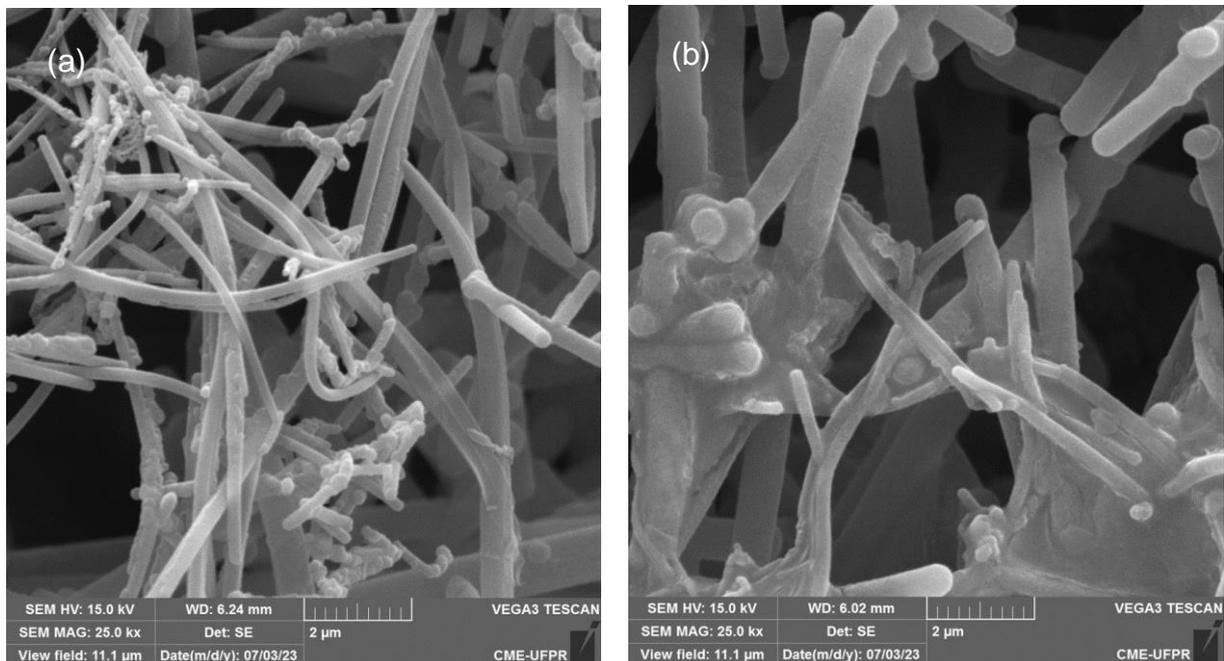
pg/mL da proteína comercial HopQ. Da mesma forma, os eletrodos com amostra foram incubados, lavados e foi feita a medida de EIS novamente.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CONSTRUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO BIOSSENSOR

A eletropolimerização dos nanotubos de polipirrol foi obtida através de imersão dos eletrodos em solução de agregados alaranjado de metila, que serviu como molde para obter a morfologia desejada, e monômeros de pirrol (Hryniewicz *et al.*, 2022). A aplicação de carga controlada tem função de garantir que a mesma quantidade de material seja depositada em todos os biossensores. A eletrodeposição do $\text{Ni}(\text{OH})_2$ foi feita por voltametria cíclica (VC) a partir de uma solução de $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ em água. A redução do íon nitrato aumenta o pH da solução e promove a precipitação do $\text{Ni}(\text{OH})_2$ (Hryniewicz, 2022). Os materiais foram caracterizados por MEV e é possível observar na FIGURA 6 (a) a estrutura nanotubular referente ao polipirrol eletropolimerizado. Após a eletrodeposição do níquel (FIGURA 6 (b)) foi possível observar uma película aderida aos nanotubos, deixando-os mais espessos.

Figura 6. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de (a) PPI-NTs e (b) PPI-NTs/ $\text{Ni}(\text{OH})_2$.



Fonte: O autor (2023).

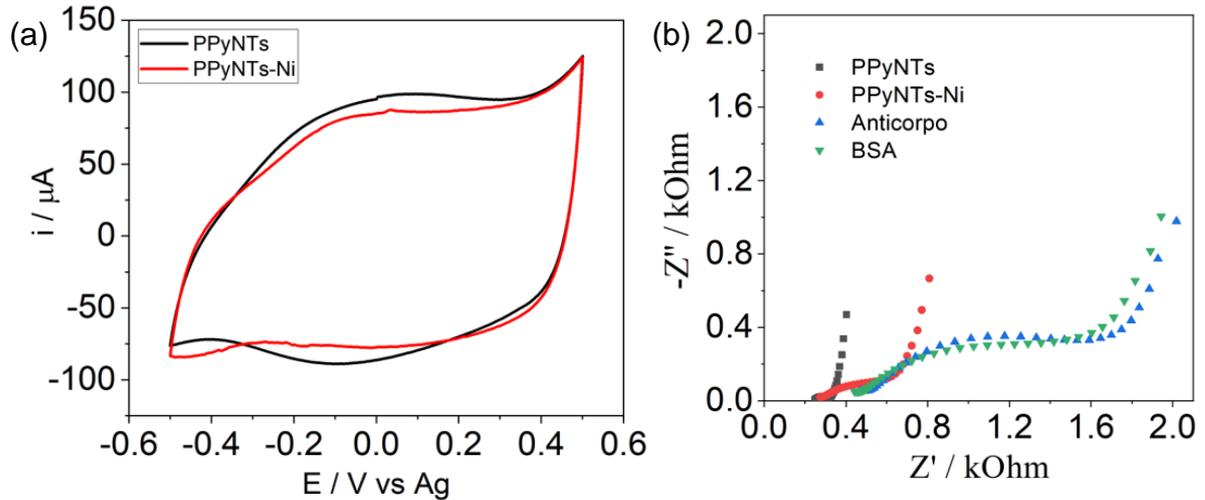
O aspecto do hidróxido de níquel observado ao MEV apresenta-se de forma distinta dos resultados observados em outros trabalhos utilizando os mesmos materiais. Em Santos *et al.* (2023) e Hryniewicz (2022), é possível observar um fino

filme de Ni(OH)_2 , com aspecto semelhante a uma rede, homogeneamente distribuído sobre os nanotubos. Contudo, essa diferença não pareceu impactar na imobilização das biomoléculas ou desempenho analítico do biossensor, como será discutido na seção 4.2.

O uso de polímeros condutores (PCs) neste dispositivo é vantajoso devido a suas propriedades, como biocompatibilidade, condutividade elétrica, possibilidade de uso em escalas nano e atividade redox, que elimina a necessidade do uso de sondas redox no eletrólito para realizar as medidas eletroquímicas, além de serem compatíveis com biomoléculas. A possibilidade de eletropolimerização *in situ* através da síntese eletroquímica também é uma vantagem. Além disso, o próprio filme de PC sofre alterações em suas propriedades intrínsecas, como sua capacitância, após a ligação do alvo ao biorreceptor sendo, portanto, um elemento ativo no mecanismo de transdução do biossensor (Santos *et al.*, 2023; Hryniewicz *et al.*, 2022; Aydemir; Malmström; Travas-Sejdic, 2016).

Ademais, o uso de hidróxido de níquel para aplicação em biossensores também é vantajoso visto que apresenta custo-benefício e habilidade de interagir com biomoléculas. A biofuncionalização do transdutor é um passo crucial no desenvolvimento dos biossensores, pois deve garantir estabilidade, reprodutibilidade e vida útil de armazenamento e afeta diretamente o desempenho analítico do dispositivo (Suni, 2021). O uso do níquel neste trabalho permite a fácil imobilização dos biorreceptores através da formação de ligação covalente entre grupamentos amina na estrutura proteica do anticorpo e o níquel na interface do eletrodo (Rahmati *et al.*, 2021). Após esse passo, foi realizado o bloqueio dos sítios de ligação inespecíficos restantes utilizando BSA 1%, importante para reduzir a adsorção de moléculas inespecíficas presentes nas amostras biológicas. A caracterização eletroquímica dos materiais por VC e o passo-a-passo da construção do biossensor por EIS pode ser observada na FIGURA 7.

FIGURA 7. (a) Caracterização dos materiais por voltametria cíclica e (b) Caracterização passo-a-passo da construção do biossensor por EIS.



Em (a) o gráfico apresenta valores de corrente em μA no eixo Y e potencial em V em comparação com o eletrodo de referência de prata no eixo X. Em (b) o Diagrama de Nyquist obtido após a adição sobre o eletrodo de PPI-NTs sobre o eletrodo, $\text{Ni}(\text{OH})_2$, anticorpos e BSA. Fonte: O autor (2023).

É possível observar na FIGURA 7 (a) que o eletrodo apresenta no voltamograma um perfil voltamétrico capacitivo, com processos redox discretos, que pode ser observado pelo formato mais retangular do gráfico, característica dos PPI-NTs. Após a adição do $\text{Ni}(\text{OH})_2$, representado em vermelho no voltamograma, há redução na corrente. A FIGURA 7 (b) mostra o aumento do Rct, que pode ser observado como um aumento no diâmetro do semicírculo no Diagrama de Nyquist, portanto um aumento da impedância, após a adição do $\text{Ni}(\text{OH})_2$ sobre os PPI-NTs, o que indica uma propriedade isolante do hidróxido de níquel que concorda com o que foi observado no voltamograma (Hryniewicz, 2022). Após a adição do anticorpo e do BSA, o Rct aumenta significativamente já que as biomoléculas formam uma camada isolante que obstrui a transferência de cargas, causando um aumento na impedância.

Para obter os valores numéricos do Rct, os dados de EIS foram ajustados utilizando um modelo de circuito elétrico equivalente contendo linha de transmissão, ideal para aplicação em materiais porosos, como é o caso dos polímeros condutores (Lazanas; Prodomidis, 2023; Hryniewicz, 2022). Os valores de Rct obtidos para a caracterização passo-a-passo apresentada na FIGURA 7 (b) estão na TABELA 2.

TABELA 2. Valores de Rct para a caracterização passo-a-passo da construção do biossensor.

Componente	Rct (Ω)
PPi-NTs	55,24
PPi-NTs/Ni(OH) ₂	495,4
PPi-NTs/Ni(OH) ₂ /Ac	1286
PPi-NTs/Ni(OH) ₂ /Ac/BSA	1265

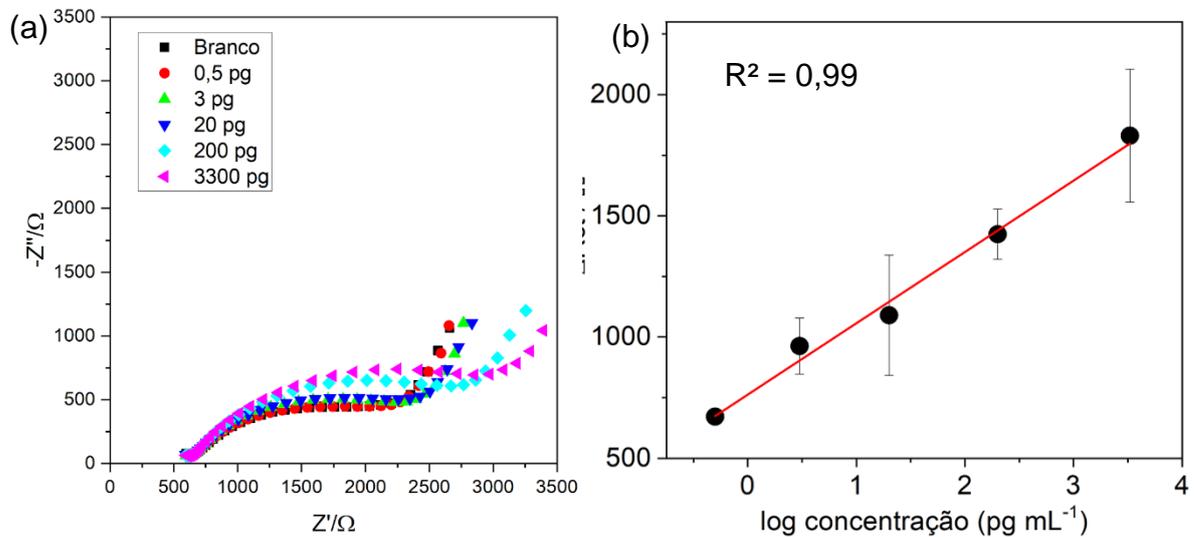
Fonte: O autor (2023).

É possível observar que há um aumento de, aproximadamente, 440 Ω no Rct após a adição de Ni(OH)₂, confirmando a eletrodeposição do material. O significativo incremento no Rct, de aproximadamente 790 Ω , após a adição das biomoléculas indica que houve bloqueio de sítios eletroativos, portanto a imobilização sobre a superfície do eletrodo foi bem sucedida. Esses dados concordam com aquilo observado na FIGURA 7 (b).

4.2 AVALIAÇÃO ANALÍTICA DO BIOSSENSOR

Para análise do desempenho analítico do biossensor, diferentes concentrações da proteína comercial HopQ foram diluídas em saliva artificial. O uso de saliva artificial é interessante para mimetizar o ambiente da cavidade bucal e para avaliar o comportamento do biossensor frente a amostras biológicas em condições padronizadas (Pytko-Polonczyk *et al.*, 2017). A resposta do biossensor frente ao incremento na concentração das proteínas foi medida por EIS e está representada no diagrama de Nyquist na FIGURA 8 (a). É possível observar um incremento no semicírculo referente ao Rct proporcional ao aumento da concentração da proteína, mostrando que o analito está sendo corretamente detectado e que a EIS é uma técnica eficiente para aplicação em biossensores. Os dados foram ajustados conforme o modelo de circuito equivalente mencionado anteriormente e a curva analítica foi construída com os valores de ΔR_{ct} , isto é, a variação do Rct entre a medida do branco e a medida da concentração analisada, e o log da concentração de proteína (FIGURA 8 (b)).

FIGURA 8. (a) Diagrama de Nyquist mostrando a resposta do biossensor frente ao incremento na concentração de proteína e (b) Curva analítica correspondente.



Em (a) observa-se o diagrama de Nyquist obtido, iniciando na leitura do branco, após a adição de concentrações crescentes da proteína-alvo. A curva analítica (b) é obtida a partir de triplicata experimental. Fonte: O autor (2023).

A faixa linear de trabalho obtida foi de 0,5 pg/mL a 3,3 ng/mL, portanto com um Limite de Quantificação (LOQ) de 0,5 pg/mL. O LOQ obtido neste trabalho é inferior ao obtido por Jaradat *et al.* (2023), de 8,6 pg/mL, indicando uma capacidade superior de detectar o antígeno da *H. pylori* em baixíssimas concentrações. Isso pode ser justificado pelo uso da técnica de EIS para detecção neste trabalho, ao invés de SWV, mais sensível. Além disso, outra vantagem é o uso de polímeros condutores na construção do biossensor, em comparação com MWCNTs e AuNPs utilizadas por Jaradat *et al.* (2023), que dispensa o uso de sonda redox no eletrólito. A comparação com os outros biossensores relatados torna-se dificultada por serem estratégias muito distintas e o LOD estar em unidades diferentes, além de informações como tempo total de reação até o resultado não terem sido informadas.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DE AMOSTRAS DE SALIVA

As reações de PCR foram realizadas com o intuito de pré-caracterizar as amostras de saliva de doadores, de condição desconhecida quanto a infecção por *H. pylori*, para a presença de *Helicobacter pylori* para comparação com os resultados obtidos pelo biossensor. Uma etapa importante para garantir que a resposta obtida pelo biossensor se devia à adição da proteína-alvo e não à pré-existência de

antígenos da bactéria nas amostras. Um par de primers e uma sonda FAM-MGB foram adquiridos da empresa Eurofins Genomics para amplificação do gene 16S rRNA da bactéria, bastante usado para detecção de *H. pylori* em amostras de saliva (Goud *et al.*, 2019; Rasmussen *et al.*, 2010; Gebara *et al.*, 2006; Bangpanwimon *et al.*, 2021), baseado na sequência descrita em Zhao *et al.* (2022).

Primer-BLAST das sequências utilizadas mostra a amplificação de um produto de 71 bp, compatível com o resultado obtido na plataforma online de PCR *in silico*, que também mostrou um produto de 71 bp para todas as cepas de *H. pylori* disponíveis na plataforma e para duas outras bactérias da ordem *Campylobacter* (*Helicobacter cetorum* e *Helicobacter acinonychis*) encontradas em animais. O resultado do Primer-BLAST indicou também possível amplificação não-específica de três sequência de mRNAs do receptor olfatório 2A7 de *Homo sapiens*, localizado no cromossomo 7, o que seria um problema dado que seriam testadas amostras humanas, contudo, devido ao grande produto amplificado que seria gerado, entre 1877 a 3016 bp, conclui-se que a amplificação desses produtos seria impossível no tempo de reação estipulado neste experimento (FIGURA 9).

FIGURA 9. Resultado do primer-BLAST.

Primer pair 1	Sequence (5->3)	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GCACAAGCGGTGGAG	Plus	15	717	731	54.56	66.67	3.00	2.00
Reverse primer	CTCTCAATGTCAAAGCCTAGG	Minus	20	787	768	55.25	50.00	6.00	6.00
Product length	71								

Products on potentially unintended templates

>XM_047443141.1 PREDICTED: Homo sapiens olfactory receptor 2A7 (LOC107987545), transcript variant X10, mRNA

product length = 3016
 Forward primer 1 GCACAAGCGGTGGAG 15
 Template 4194G.C..... 4288

Forward primer 1 GCACAAGCGGTGGAG 15
 Template 7209 CA..... 7195

>XM_047443140.1 PREDICTED: Homo sapiens olfactory receptor 2A7 (LOC107987545), transcript variant X9, mRNA

product length = 3016
 Forward primer 1 GCACAAGCGGTGGAG 15
 Template 3383G.C..... 3397

Forward primer 1 GCACAAGCGGTGGAG 15
 Template 6398 CA..... 6384

>XM_047443137.1 PREDICTED: Homo sapiens olfactory receptor 2A7 (LOC107987545), transcript variant X6, mRNA

product length = 1877
 Forward primer 1 GCACAAGCGGTGGAG 15
 Template 3383G.C..... 3397

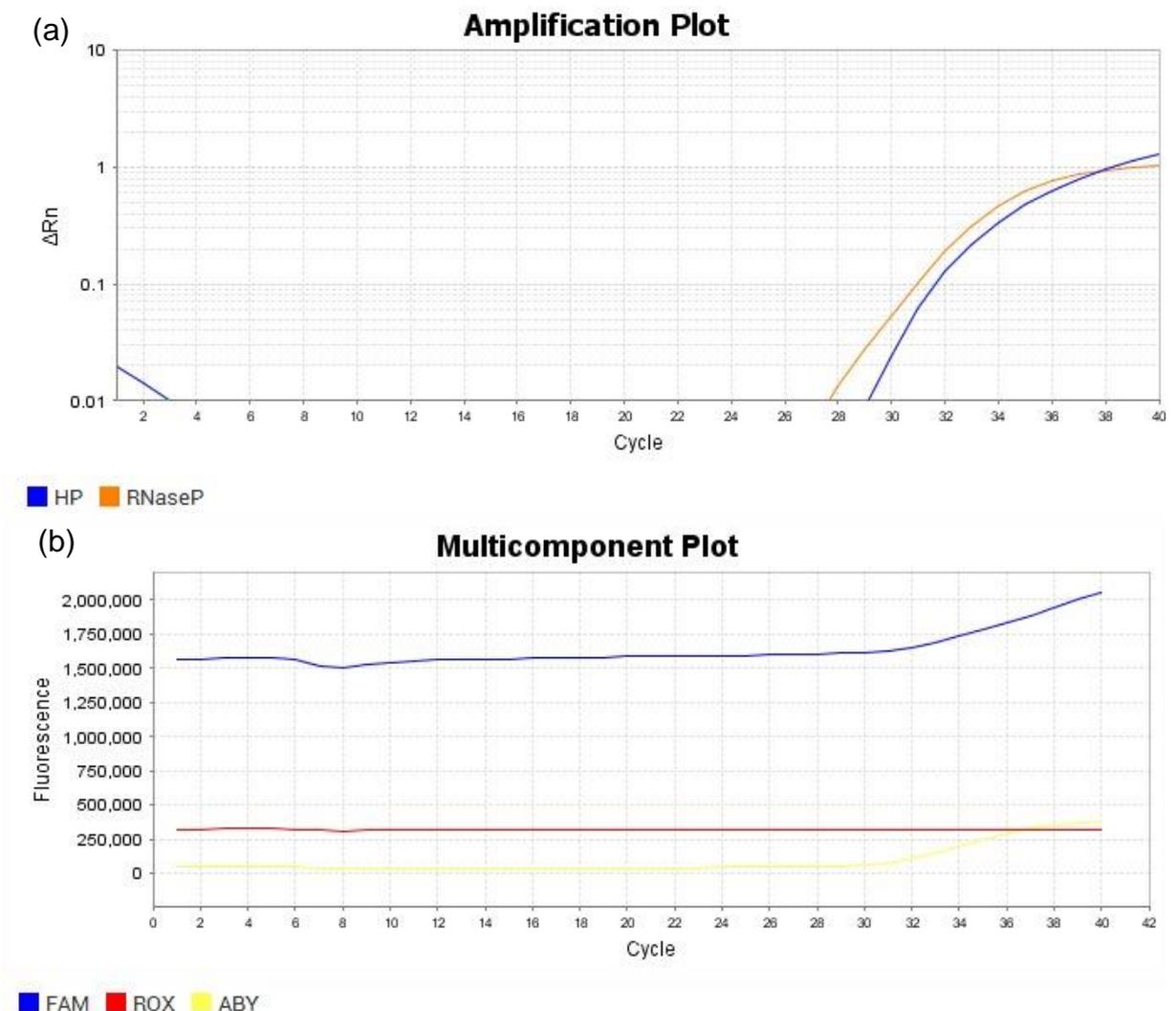
Forward primer 1 GCACAAGCGGTGGAG 15
 Template 5259 CA..... 5245

É possível observar a sequência dos primers utilizados, o comprimento, temperatura de anelamento, porcentagem de bases GC, entre outras informações. Fonte: National Center for Biotechnology Information (NCBI) - Primer-BLAST.

Foi realizada RT-qPCR com 5 amostras de saliva, previamente submetidas a extração do material genético, negativas para SARS-CoV-2, de acordo com os

parâmetros informados na seção de Materiais e Métodos. Água foi usada como controle negativo e o gene da RNase P foi usado como controle interno. Os resultados mostraram amplificação para ambos os genes na maioria das amostras, como pode ser observado na FIGURA 10, onde verifica-se sinal de amplificação a partir do ciclo 28 em FIGURA 10 (a) e intensidade de fluorescência superior para a sonda correspondente aos primers para *H. pylori* em FIGURA 10 (b) para uma das amostras testadas.

FIGURA 10. Gráficos de (a) Amplificação de uma das amostras testadas e (b) Dados não-normalizados de fluorescência por ciclo de uma das amostras.

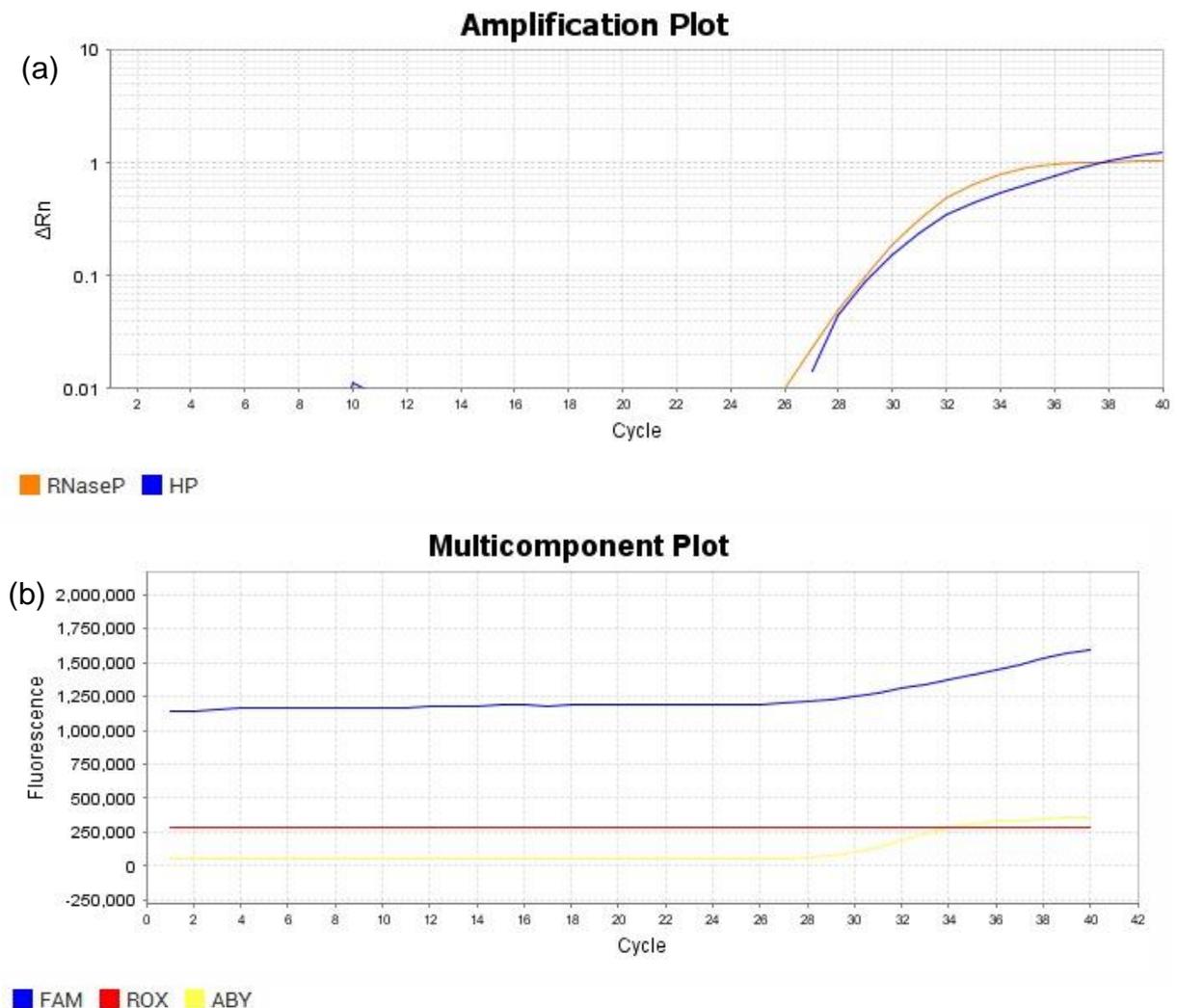


Em (a) é possível observar a amplificação correspondente ao controle interno humano RNase P em azul e corresponde aos primers para *H. pylori* em laranja. O parâmetro ΔRn refere-se a variação da intensidade do sinal de fluorescência experimental em comparação com a intensidade do sinal emitido pela sonda de referência (ROX). Em (b) observa-se um gráfico de intensidade de fluorescência por ciclo de amplificação, com fluorescência da sonda FAM em azul, que corresponde aos primers para *H. pylori*, da sonda ROX em vermelho, correspondente a fluorescência de *background* do equipamento, e da sonda ABY em amarelo, correspondente aos primers da RNase P.

Fonte: O autor (2023).

Frente a esses resultados, que sugerem uma concentração de material da bactéria comparável ou superior à concentração de material genético humano, o experimento foi repetido com outras 4 amostras de saliva nas mesmas condições descritas anteriormente para verificar a reprodutibilidade dos resultados. A temperatura de anelamento foi elevada para 60°C para aprimorar a especificidade da amplificação e a concentração de primers e sonda para *H. pylori* reduzida em 50% para limitar uma possível fluorescência não-específica da sonda. Contudo, os resultados obtidos foram semelhantes (FIGURA 11).

FIGURA 11. Gráficos de (a) Amplificação de uma das amostras testadas e (b) Dados não-normalizados de fluorescência por ciclo de uma das amostras.

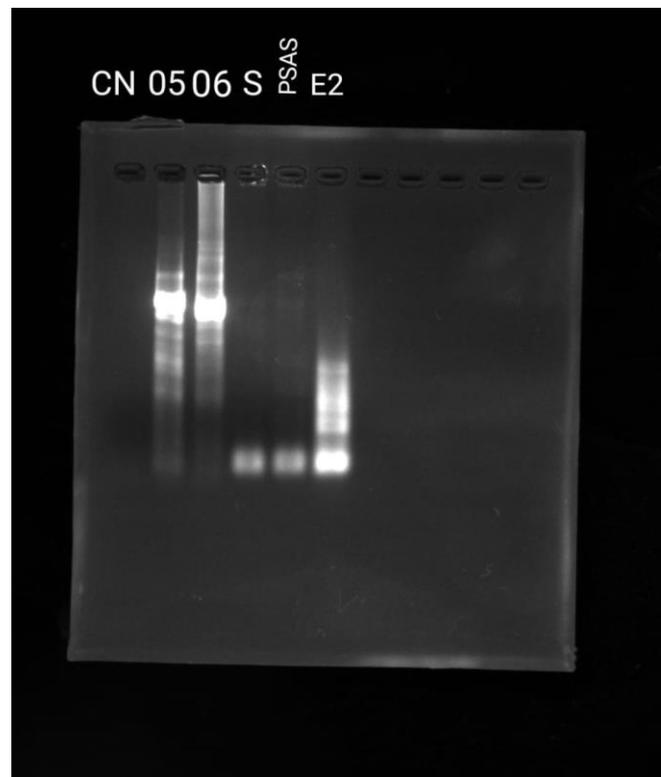


Em (a) é possível observar a amplificação correspondente ao controle interno humano RNase P em azul e corresponde aos primers para *H. pylori* em laranja. O parâmetro ΔRn refere-se a variação da intensidade do sinal de fluorescência experimental em comparação com a intensidade do sinal emitido pela sonda de referência (ROX). Em (b) observa-se um gráfico de intensidade de

fluorescência por ciclo de amplificação, com fluorescência da sonda FAM em azul, que corresponde aos primers para *H. pylori*, da sonda ROX em vermelho, correspondente a fluorescência de *background* do equipamento, e da sonda ABY em amarelo, correspondente ao primers da RNase P. Fonte: O autor (2023).

Então, para verificar se a fluorescência observada tratava-se de fato de um produto sendo amplificado pelos primers específicos para o gene da *H. pylori*, ou se o resultado observado poderia se dar devido problemas experimentais, foi realizada PCR convencional utilizando apenas os primers para *H. pylori*, sem controle interno. Foram utilizadas duas amostras de DNA de sangue de pacientes saudáveis, escolhidas com o intuito de serem controle negativos visto que não deve haver a presença de material genético de *H. pylori* em sangue, duas amostras de saliva, uma que havia obtido resultado positivo para *H. pylori* na RT-qPCR e outra não testada anteriormente. Os produtos foram submetidos a corrida eletroforética em gel de agarose, assim como o produto amplificado por RT-qPCR da amostra de saliva positiva para *H. pylori* utilizada na PCR convencional para comparação. Os resultados podem ser observados na FIGURA 12.

FIGURA 12. Corrida eletroforética em gel de agarose dos produtos amplificados com os primers para *H. pylori*.

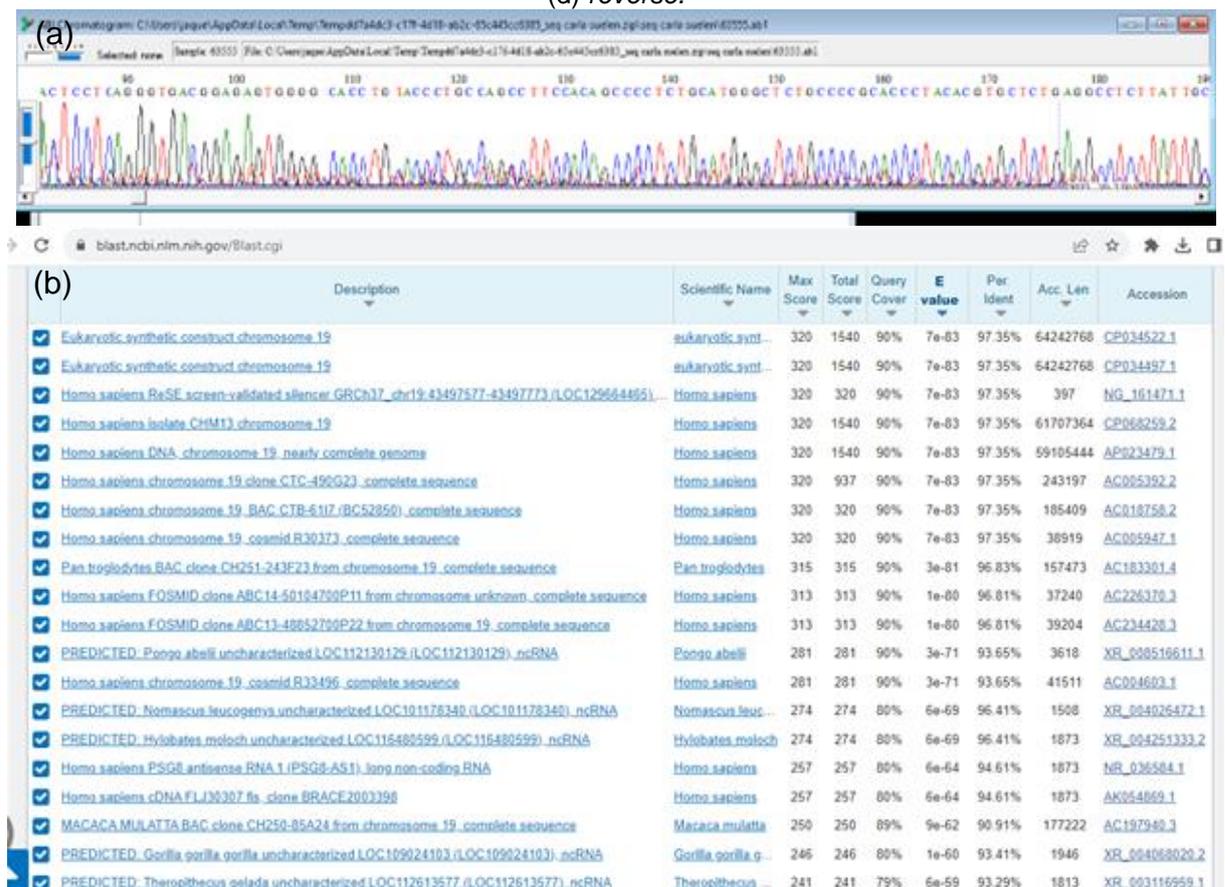


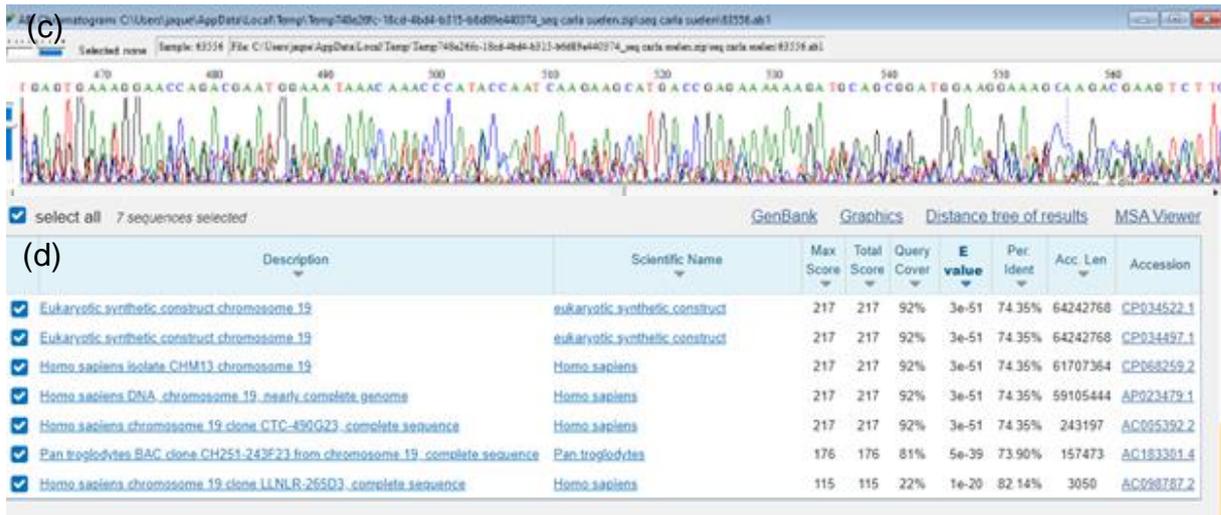
CN: controle negativo; 05 e 06: amostras de DNA de sangue; S: saliva positiva para *H. pylori* pela RT-qPCR; PSAS: saliva não testada anteriormente; E2: produto amplificado por RT-qPCR da mesma amostra que o poço S. Fonte: O autor (2023).

É possível observar uma banda de peso molecular maior, portanto que migrou menos, para as amostras de DNA de sangue em comparação com bandas de peso molecular menor para as amostras de saliva. Não foi utilizado um marcador de peso molecular, por isso não é possível saber o peso aproximado dos produtos observados.

Os produtos amplificados foram submetidos a sequenciamento de Sanger utilizando o kit Big Dye Terminator. O sequenciamento das amostras de sangue, identificadas como 05 e 06 na FIGURA 12, mostrou um produto de 206 pb para a fita *anti-sense* ou *forward*, com uma boa qualidade dos dados, e um produto de 601 pb para a fita *sense* ou *reverse*, com uma baixa qualidade dos dados, como se houvessem fragmentos misturados. As sequências obtidas foram analisadas com a ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (FIGURA 13).

FIGURA 13. Resultado do eletroferograma e BLAST para a sequência (a), (b) *forward* e (c), (d) *reverse*.





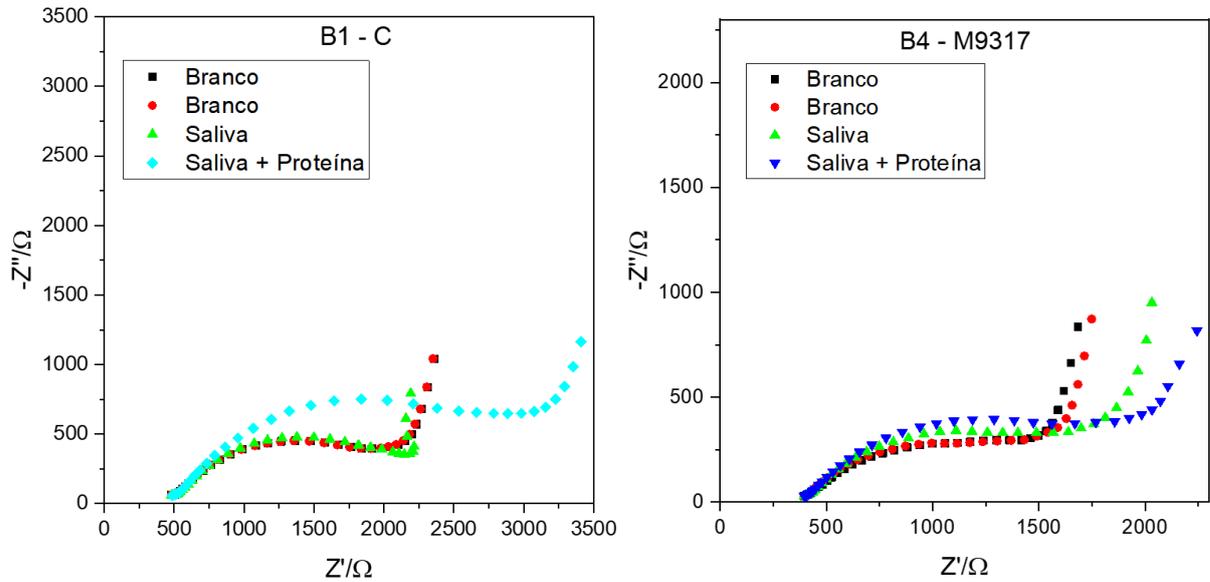
Em (a) e (c) observa-se os eletroferogramas obtidos do equipamento utilizado para o sequenciamento e em (b) e (d) observa-se o resultado obtido com a ferramenta BLAST, do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Fonte: O autor (2023).

A análise de ambas as seqüências mostrou que um gene humano referente ao cromossomo 19 estava sendo amplificado pelos primers encomendados específicos para *H. pylori*. O sequenciamento dos produtos da PCR das amostras de saliva infelizmente não foi bem-sucedido, provavelmente devido a pouca quantidade de produto. Portanto, é possível inferir que os primers enviados estavam contaminados com primers ou fragmentos para gene humano. Devido a este percalço, as amostras de saliva testadas com o biossensor desenvolvido não estão pré-caracterizadas.

4.4 DETECÇÃO EM AMOSTRAS CLÍNICAS DE SALIVA

Para avaliar o funcionamento do biossensor em amostras de complexidade proteica superior à da saliva artificial, seis amostras de saliva de pacientes previamente caracterizadas como negativas para SARS-CoV-2 foram utilizadas. As amostras foram diluídas em PBS no fator de diluição 1:100 e foram medidas puras e após a adição da proteína-alvo HopQ para observar se haveria uma resposta específica e equivalente na medida do biossensor. Os resultados podem ser observados na FIGURA 14.

FIGURA 14. Diagramas de Nyquist para duas amostras de saliva.



Diagramas de Nyquist obtidos para duas leituras de branco, representado nas cores preto e vermelho, para a saliva diluída pura, em verde, e após a adição da proteína, em azul. Fonte: O autor (2023).

É possível observar que a adição de proteína aumenta consideravelmente o R_{ct} em comparação com a saliva diluída pura em PBS, demonstrando a detecção específica do analito mesmo em amostras reais. Contudo, a resposta inicial à adição de saliva diluída pura variou entre os biossensores: pode ser visto que em B1 não houve incremento significativo do R_{ct} após a adição da saliva, mas houve em B4. Como a pré-caracterização das amostras por RT-qPCR não foi bem-sucedida, não é possível saber se essa resposta é devida a presença de antígeno da *H. pylori* nas amostras de saliva utilizadas ou à adsorção inespecífica de outras proteínas presentes na saliva, mas de qualquer forma, os dados mostram a capacidade do biossensor de detectar a proteína-alvo em amostras complexas e foi coerente na maioria dos biossensores testados, como pode ser visto na TABELA 3.

TABELA 3. Valores em ΔR_{ct} dos biossensores com saliva e após adição da proteína-alvo.

ELETRODO	A1	B1	B3	B4
Saliva	333	145	71	174
Saliva + Proteína	554	888	237	384

Os valores apresentados estão em ΔR_{ct} , portanto reduzidos do valor de R_{ct} do branco, em Ω . Fonte: O autor (2023).

A TABELA 3 mostra apenas o resultado de quatro biossensores, portanto apenas de quatro amostras, pois dois mostraram variações significativas entre as medidas do branco, o que pode ser devido a instabilidade dos materiais e por isso os valores medidos podem não ser confiáveis.

A saliva tem sido bastante explorada no desenvolvimento de novos métodos para diagnóstico da infecção ativa por *H. pylori*. Entre os testes imunocromatográficos, Yee *et al.* (2013) avaliaram o desempenho de dois testes rápidos imunocromatográficos, um para detecção da proteína flagelina da bactéria e outro para detecção da urease em amostras de saliva em 201 indivíduos, sintomáticos para dor de estômago e indigestão e assintomáticos. Os resultados obtidos mostraram correlação significativamente estatística entre os resultados dos testes na saliva e o teste sorológico, e que os indivíduos negativos para ambos os testes de saliva tinham uma chance de 9,5:1 de serem negativos também para o UBT. Além disso, >82% dos indivíduos positivos para o teste UBT também eram positivos para os testes de saliva. A sensibilidade analítica do teste foi dada como 10 ng/mL. O teste rápido para urease apresentou significativamente mais resultados positivos que o teste da flagelina em saliva.

Yang *et al.* (2015) também avaliaram um teste imunocromatográfico, o *H. pylori* saliva antigen (HPS) test da empresa Ameritek (Estados Unidos), com o objetivo de validar o método para triar e referir pacientes para exames endoscópicos. Foram testados 104 pacientes e os resultados foram comparados com endoscopia, RUT e UBT, sendo que o padrão-ouro usado para comparativo foi determinado como pelo menos dois resultados positivos por métodos diferentes. A sensibilidade analítica obtida para o teste foi de 10 ng/mL do antígeno urease e o resultado foi obtido após 20 a 30 minutos. Obteve-se um valor preditivo negativo (NPV, do inglês “*negative predictive value*”) de 88,33%, sensibilidade de 71,43% com especificidade de 55,42%, que pode ser explicada pela existência de outras bactérias produtoras de urease que colonizam a cavidade oral, em concordância com aquilo observado por Yee *et al.* (2013).

O mesmo teste rápido imunocromatográfico (Ameritek) foi testado por Khadir *et al.* (2016) em 153 pacientes, avaliados também por PCR, em amostras de biópsia gástrica e histologia. Em contraste com outros autores, foram obtidos dados de sensibilidade de 29,79% e especificidade de 90,70%, e valor preditivo positivo (PPV,

do inglês “*positive predictive value*”) de 77,78% e NPV de 54,17%. Os autores justificam como uma possível baixa afinidade dos anticorpos do teste para o antígeno ou também baixas concentrações do antígeno da bactéria na saliva.

Dane e Gurbuz (2016) testaram amostras de placa dentária de 35 crianças positivas para *H. pylori* de acordo com biópsia gástrica utilizando o teste rápido CLOtest (do inglês, *Campylobacter-like organism test*). Esse teste é utilizado para detectar a presença da urease. 29 pacientes dos 35 (82,9%) foram positivos para *H. pylori* na placa dentária.

Wang *et al.* (2023a) desenvolveram um teste rápido de ensaio de fluxo lateral mais sensível baseado em microesferas fluorescentes. Anticorpos específicos para *H. pylori* acoplados à microesferas são incubados com 60 µL de amostra de saliva adicionada de bactérias *H. pylori* cultivadas em laboratório. Os resultados são obtidos em 8 minutos e podem ser qualitativamente observados a olho nu, com limite de detecção de 10² CFU/ml, ou quantitativamente analisados pelo software ImageJ, com limite de detecção de 1,05 CFU/mL. Os autores não informam qual antígeno especificamente é detectado.

Métodos de biologia molecular também têm sido empregados para desenvolvimento de alternativas diagnósticas. Jara *et al.* (2022) avaliaram a eficácia de PCR em amostras de saliva e de mucosa oral em comparação com o RUT em amostras de biópsia gástrica de 21 pacientes do grupo de estudo e 41 pacientes do grupo controle. Uma correlação estatisticamente significativa foi encontrada entre a detecção por RUT e PCR da mucosa oral, mas não entre RUT e PCR em saliva. A sensibilidade do método foi de 92,3% de sensibilidade e 98% de especificidade.

Bürgers *et al.* (2008) analisaram a presença de *H. pylori* em 94 pacientes que possuíam resultado de endoscopia digestiva alta. Desses, 29 estavam positivos para *H. pylori* de acordo com a biópsia gástrica. DNA de *H. pylori* foi encontrado por PCR Nested na cavidade oral de 16 (17%) dos 94 pacientes, dos quais 6 também eram positivos de acordo com a biópsia gástrica. Já entre os 65 pacientes negativos pela biópsia, 10 (15%) possuíam DNA de *H. pylori* na cavidade oral. 43% dos pacientes eram soropositivos para *H. pylori*, mas em nenhum desses foi detectado a bactéria na cavidade oral. Esses resultados mostram que a infecção por *H. pylori* pode existir na cavidade bucal independente da sua colonização no estômago.

Já Yamada *et al.* (2008) empregaram a técnica de Nested PCR, mais sensível que a PCR convencional, para detectar DNA da bactéria usando 2 pares de primers

específicos para um fragmento de 860 pares de base (pb). Amostras de suco gástrico, saliva e urina de 39 pacientes submetidos a endoscopia foram analisadas. Obtiveram positividade pela PCR 100% das amostras de suco gástrico, 71,8% das amostras de saliva e 50% das amostras de urina, com uma correlação estatisticamente significativa entre suco gástrico e saliva. Os resultados não foram comparados com o padrão-ouro.

Outra técnica de biologia molecular interessante para detecção de DNA em amostras biológicas é a amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP, do inglês “*loop-mediated isothermal amplification*”), capaz de amplificar ácidos nucleicos sem a necessidade de variação de temperatura, em temperaturas de 60°C a 65°C, e sem equipamentos complexos, útil para aplicação POC. Sohrabi *et al.* (2020) empregaram essa técnica associada a SYBR Green I, permitindo obter os resultados a olho nu, para detectar o gene *ureC* em amostras de saliva, escovação oral e fezes de 51 pacientes submetidos a endoscopia. Biópsia de mucosa gástrica foi utilizada como padrão-ouro para comparação com os resultados obtidos. O melhor desempenho analítico foi obtido com amostras de saliva, com uma sensibilidade de 58,1%, especificidade de 84,2%, PPV de 85,7% e NPV de 55,2%. Ainda, o método obteve um limite de detecção de 0,25 fg/mL de DNA genômico de *H. pylori*, 40.000 vezes mais sensível que a PCR convencional que obteve LOD de 0,01 ng/mL, com tempo de reação de 60 minutos.

Bangpanwimon *et al.* (2021) desenvolveram um sistema colorimétrico com amplificação por LAMP baseado em nanopartículas magnéticas acopladas a primers específicos para o gene 16S rRNA da *H. pylori*. Amplicons de LAMP se hibridizam com os primers imobilizados nas nanopartículas e com primers em solução acoplados a biotina e a reação colorimétrica acontece após a adição de um conjugado de NeutrAvidina com a enzima peroxidase de rábano (HRP, do inglês “*horseradish peroxidase*”). A leitura do resultado é feita por espectrofotometria. O método foi testado em amostras de *H. pylori* cultivada em laboratório e obteve especificidade de 100%, não detectando isolados de outras bactérias, e LOD de 400 CFU/mL, e também em amostras de saliva adicionadas de bactérias cultivadas, nas quais foi obtido um LOD de 40 CFU/mL.

Wang *et al.* (2023b) desenvolveram outro método alternativo utilizando a nova técnica de amplificação isotérmica chamada amplificação assistida por recombinase (RAA, do inglês “*recombinase-aided amplification*”), que opera em temperaturas mais baixas que a LAMP, entre 30°C a 42°C. Neste trabalho, a RAA foi associada a sondas

de DNAzimas assistidas por ácido peptonucleico (PNA, do inglês “*peptide nucleic acids*”). As DNAzimas utilizadas neste trabalho tem atividade de peroxidase e formam substratos cromogênicos, possibilitando uma detecção colorimétrica. Quando o material genético da *H. pylori* está ausente, o PNA se liga à DNAzima e gera a atividade de peroxidase que catalisa a mudança de cor da solução. Na presença da *H. pylori*, após a amplificação por RAA do gene *ureA* por primers específicos, o PNA se liga à estrutura de DNA de fita dupla dos amplicons gerados e impede a mudança de cor. A leitura dos resultados é feita a olho nu e por espectrofotometria, obtendo LOD de 1 CFU/mL e 0,105 CFU/mL, respectivamente. Amostras de saliva contaminadas artificialmente também foram testadas e foi obtido uma taxa de recuperação entre 84,6% e 106,9%. O tempo total de reação até o resultado é de 100 minutos.

Desde sua descoberta em 2012, o sistema CRISPR/Cas tem sido amplamente aplicado em edição genômica e diagnóstico molecular. Zhang *et al.* (2023) aplicaram o sistema CRISPR/Cas12a para desenvolver um arranjo para detecção de *H. pylori* em amostras de saliva. O DNA alvo ativa a trans-clivagem da enzima Cas12a, que cliva sequências reporter, gerando um sinal de fluorescência. Em seguida, acontece uma reação de amplificação isotérmica nomeada amplificação por deslocamento de fita (SDA, do inglês “*strand displacement amplification*”), gerando novos amplicons de DNA-alvo para serem clivados pela Cas12a, aumentando a sensibilidade do método. A leitura dos resultados é feita com um sistema de transferência de energia de ressonância por fluorescência (FRET, do inglês “*fluorescence resonance energy transfer*”). O método obteve resultados positivos em amostras de saliva de pacientes positivos pelo método UBT. O tempo de reação é de 2 horas e 30 minutos. O gene-alvo específico utilizado no trabalho não foi divulgado pelos autores, assim como não foi feita uma análise sobre o desempenho analítico do método.

Em comparação com o dispositivo desenvolvido neste trabalho, os testes imunocromatográficos são notoriamente menos sensíveis. O teste rápido para detecção da *H. pylori* em saliva da empresa Ameritek, bastante investigado por diversos autores, possível de obter os resultados entre 20 e 30 minutos, apresenta sensibilidade analítica de 10 ng/mL, mais de mil vezes menos sensível que o LOQ do presente trabalho, em 0,5 pg/mL. O teste rápido imunocromatográfico desenvolvido por Wang *et al.* (2023a) é mais sensível, mas demanda 60 µL de amostra, em comparação com biossensor aqui apresentado, que demanda 15 µL de amostra. Os

métodos de biologia molecular são extremamente sensíveis e específicos, mas há uma demora até a obtenção dos resultados de 60 a 150 minutos, um tempo de espera no mínimo quatro vezes superior ao biossensor eletroquímico impedimétrico. Ademais, um fator importante buscado pelas plataformas em desenvolvimento é a visualização e interpretação fácil dos resultados. Por permitir integração com dispositivos eletrônicos e portáteis, os resultados obtidos pelo biossensor eletroquímico desenvolvido neste trabalho, além de serem muito sensíveis, podem ser facilmente compreendidos.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estabeleceu em 2003 o critério ASSURED - *affordable, sensitive, specific, user-friendly, rapid, equipment-free and deliverable to the end user*, que pode ser traduzido como acessível, sensível, específico, fácil de usar, rápido, livre de equipamento e portátil, para definir características ideais para testes diagnósticos POC. Recentemente, o critério foi atualizado para REASSURED, incorporando “*real-time connectivity*” e “*ease of specimen collection*”, que pode ser traduzido como conectividade em tempo real e facilidade para coleta de amostra (Antiochia, 2022). Pelas características do sensor eletroquímico, como possibilidade de integração com equipamentos eletrônicos, de portabilidade e facilidade de uso, e pelas características do biorreceptor e do tipo de amostra utilizado, como sensibilidade, especificidade, facilidade de coleta e acessibilidade, é possível constatar que o dispositivo eletroquímico para detecção de *H. pylori* em amostras de saliva cumpre os requisitos determinados pela OMS para uma plataforma diagnóstica aplicável no POC.

Apesar de não ter sido possível realizar a pré-caracterização das amostras por métodos moleculares para a presença da *H. pylori*, é possível observar pelos testes com a adição da proteína comercial que o biossensor é capaz de detectar o analito de forma específica. Futuros estudos são necessários para avaliar a eficácia do uso da plataforma em contexto clínico, como ensaios de especificidade, ensaios de reatividade cruzada com outros patógenos, ensaios de estabilidade e vida útil de armazenamento da plataforma. Além disso, testes com salivas de pacientes submetidos a endoscopia e caracterizados pelo padrão-ouro são necessários para determinar a sensibilidade, especificidade e valor de *cut-off* do método diagnóstico.

A detecção de material genético da *H. pylori* por PCR em amostras de saliva de pacientes com resultado do padrão-ouro também pode contribuir para elucidar a

correlação entre a presença da bactéria na cavidade oral e a infecção gástrica e a prevalência da bactéria na saliva de pacientes brasileiros.

5 CONCLUSÕES

No presente trabalho foi desenvolvido um biossensor eletroquímico impedimétrico para detecção da proteína HopQ da bactéria *Helicobacter pylori* em saliva. O dispositivo apresenta uma ampla faixa de trabalho de 0,5 pg/mL a 3,3 ng/mL, com um baixo LOQ de 0,5 pg/mL. A detecção é feita em menos 15 minutos com 15 µL de amostra, com um tempo de incubação de amostra de 15 minutos, valores competitivos com outros biossensores disponíveis na literatura científica. O uso de saliva é vantajoso para o diagnóstico dessa infecção, que tem alta prevalência no Brasil, pois é de fácil coleta, não-invasiva, não necessita de procedimentos complexos para ser realizada e é indolor, podendo reduzir os custos e facilitar a obtenção do diagnóstico. O biossensor apresenta bom desempenho na amostra estudada, com uma detecção específica do analito mesmo em uma amostra biológica complexa, utilizando um baixo volume amostral por análise e sem a necessidade de pré-tratamento. Ainda, outras vantagens incluem a possibilidade de portabilidade e a facilidade de uso sem prejudicar a sensibilidade e especificidade do método. É o único biossensor impedimétrico para detecção do antígeno HopQ da *H. pylori* em saliva descrito na literatura no conhecimento da autora.

Além do estudo da construção do biossensor, neste trabalho também foram realizadas técnicas de Biologia Molecular com o intuito de pré-caracterizar as amostras de saliva para a presença da *H. pylori*. Infelizmente, a caracterização não foi bem-sucedida devido ao fato de os primers desenhados e encomendados estarem contaminados. Um relatório foi enviado para avaliação técnica especializada da empresa Eurofins Genomics para investigação do fato.

Estudos posteriores são necessários com amostras pré-caracterizadas e com um número amostral maior para determinar parâmetros importantes como a sensibilidade, especificidade e acurácia do teste. Investigações de especificidade e reação cruzada com interferentes como outras bactérias da família *Helicobacteraceae* também são importantes para avaliar a capacidade de aplicação clínica do dispositivo. A avaliação de estabilidade e vida útil de armazenamento também é bem-vinda para determinar se seria possível disponibilizar a tecnologia desenvolvida no mercado ou quais parâmetros teriam que ser melhorados para tal. Ademais, seria interessante avaliar se seria possível melhorar a sensibilidade do biossensor aplicando biomoléculas mais inovadoras e com melhor custo-benefício que anticorpos

tradicionais, como VHHs ou aptâmeros, visto que a interface permite essa flexibilidade de combinar diferentes biomoléculas.

Para todos os efeitos, o presente trabalho demonstra os benefícios de uma equipe multidisciplinar no desenvolvimento de metodologias alternativas de diagnóstico e a importância do papel do biomédico nessa cooperação a favor da produção de tecnologia nacional para aplicação na área da saúde.

REFERÊNCIAS

- AL-AHMAD, A. et al. Is *Helicobacter pylori* resident or transient in the human oral cavity? **Journal of Medical Microbiology**, v. 61, n. 8, p. 1146–1152, 1 ago. 2012.
- ANTIOCHIA, R. Electrochemical biosensors for SARS-CoV-2 detection: Voltametric or impedimetric transduction? **Bioelectrochemistry**, v. 147, p. 108190, out. 2022.
- AZAD, K. N. et al. An Easily Digestible Review of *Helicobacter pylori* Diagnostics. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 44, n. 6, p. 51–61, mar. 2022.
- BANGPANWIMON, K. et al. Non-Invasive Colorimetric Magneto Loop-Mediated Isothermal Amplification (CM-LAMP) Method for *Helicobacter pylori* Detection. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 4, p. 501–509, 28 abr. 2021.
- BHALLA, N. et al. Introduction to biosensors. **Essays in Biochemistry**, v. 60, n. 1, p. 1–8, 30 jun. 2016.
- BIKANDI, J. et al. *In silico* analysis of complete bacterial genomes: PCR, AFLP–PCR and endonuclease restriction. **Bioinformatics**, v. 20, n. 5, p. 798–799, 22 mar. 2004.
- BRAVO, D. et al. *Helicobacter pylori* in human health and disease: Mechanisms for local gastric and systemic effects. **World Journal of Gastroenterology**, v. 24, n. 28, p. 3071–3089, 14 jul. 2018.
- BROWN, L. M. *Helicobacter pylori*: Epidemiology and Routes of Transmission. **Epidemiologic Reviews**, v. 22, n. 2, p. 283–297, 1 jan. 2000.
- BÜRGERS, R. et al. *Helicobacter pylori* in human oral cavity and stomach. **European Journal of Oral Sciences**, v. 116, n. 4, p. 297–304, ago. 2008.
- CADAMURO, A. C. T. *Helicobacter pylori* infection: Host immune response, implications on gene expression and microRNAs. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 6, p. 1424, 2014.
- CARDOS, A. I. et al. Evolution of Diagnostic Methods for *Helicobacter pylori* Infections: From Traditional Tests to High Technology, Advanced Sensitivity and Discrimination Tools. **Diagnostics**, v. 12, n. 2, p. 508, 16 fev. 2022.
- CCATES - CENTRO COLABORADOR DO SUS: AVALIAÇÃO DE TECNOLOGIAS E EXCELÊNCIA EM SAÚDE. **Diretrizes para diagnóstico e erradicação do utilizando medicamentos da Atenção Primária (SUS)**. NT 02/2014. Belo Horizonte, 2014.
- CELLINI, L. et al. Coccoid *Helicobacter pylori* Not Culturable *In vitro* Reverts in Mice. **Microbiology and Immunology**, v. 38, n. 11, p. 843–850, nov. 1994.
- CESEWSKI, E.; JOHNSON, B. N. Electrochemical biosensors for pathogen detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 159, p. 112214, jul. 2020.

- CHEN, L.-L. et al. Detection of *Helicobacter pylori* in dental plaque using a DNA biosensor for noninvasive diagnosis. **RSC Advances**, v. 8, n. 38, p. 21075–21083, 2018.
- CHEY, W. D. et al. ACG Clinical Guideline: Treatment of *Helicobacter pylori* Infection. **American Journal of Gastroenterology**, v. 112, n. 2, p. 212–239, fev. 2017.
- CHIANG, T.-H. et al. Mass screening and eradication of *Helicobacter pylori* as the policy recommendations for gastric cancer prevention. **Journal of the Formosan Medical Association**, v. 121, n. 12, p. 2378–2392, dez. 2022.
- COELHO, L. G. V. et al. IVth Brazilian Consensus Conference on *Helicobacter pylori* infection. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 55, n. 2, p. 97–121, 16 abr. 2018.
- COSTA, R. A. L. D. et al. *Helicobacter pylori* e seus aspectos clínicos-epidemiológicos: uma revisão de literatura. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 2, p. 14420–14438, 2021.
- DANE, A; GURBUZ, T. Clinical Comparative Study of the Effects of *Helicobacter pylori* Colonization on Oral Health in Children. **Pakistan Journal of Medical Sciences**, v. 32, n. 4, 31 dez. 1969.
- EL KHADIR, M. et al. Detection of *Helicobacter pylori* urease antigen in saliva in patients with different gastric H. pylori status. **Journal of the Chinese Medical Association**, v. 79, n. 7, p. 363–367, jul. 2016.
- GEBARA, E. C. E. et al. Persistence of *Helicobacter pylori* in the oral cavity after systemic eradication therapy. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 33, n. 5, p. 329–333, maio 2006.
- GENELHOUD, G. et al. Comparison of SARS-CoV-2 molecular detection in nasopharyngeal swab, saliva, and gargle samples. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 103, n. 2, p. 115678, jun. 2022.
- GISBERT, J. P. et al. Role of partner's infection in reinfection after *Helicobacter pylori* eradication: **European Journal of Gastroenterology & Hepatology**, v. 14, n. 8, p. 865–871, ago. 2002.
- GOUD, E. VS. S. et al. Identification of *Helicobacter pylori* in saliva of patients with and without gastritis by polymerase chain reaction. **Journal of Pharmacy And Bioallied Sciences**, v. 11, n. 7, p. 523, 2019.
- HASSAN, R. Y. A. Advances in Electrochemical Nano-Biosensors for Biomedical and Environmental Applications: From Current Work to Future Perspectives. **Sensors**, v. 22, n. 19, p. 7539, 5 out. 2022.
- HOOI, J. K. Y. et al. Global Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection: Systematic Review and Meta-Analysis. **Gastroenterology**, v. 153, n. 2, p. 420–429, ago. 2017.

HRYNIEWICZ, B. M. et al. Development of polypyrrole (nano)structures decorated with gold nanoparticles toward immunosensing for COVID-19 serological diagnosis. **Materials Today Chemistry**, v. 24, p. 100817, jun. 2022.

HRYNIEWICZ, B. M. et al. Influence of the pH on the electrochemical synthesis of polypyrrole nanotubes and the supercapacitive performance evaluation. **Electrochimica Acta**, v. 293, p. 447–457, jan. 2019.

HRYNIEWICZ, B. M. **Polímeros condutores aplicados no desenvolvimento de biossensores para COVID-19, no armazenamento de energia e na degradação eletrocatalítica de poluentes**. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2022.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (ED.). **A review of human carcinogens**. Lyon: International agency for research on cancer, 2012.

J PYTKO-POLONCZYK, J. et al. Artificial saliva and its use in biological experiments. *Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society*, v. 68, n. 6, p. 807–813, dez. 2017.

JARA, M. G. et al. PCR-detection of *Helicobacter pylori* from oral mucosa: A feasible early diagnostic tool. **Annals of Diagnostic Pathology**, v. 61, p. 152022, dez. 2022.

JARADAT, H. et al. Novel Sensitive Electrochemical Immunosensor Development for the Selective Detection of HopQ *H. pylori* Bacteria Biomarker. **Biosensors**, v. 13, n. 5, p. 527, 8 maio 2023.

KAO, C.-Y.; SHEU, B.-S.; WU, J.-J. *Helicobacter pylori* infection: An overview of bacterial virulence factors and pathogenesis. **Biomedical Journal**, v. 39, n. 1, p. 14–23, fev. 2016.

KAYALI, S. et al. *Helicobacter pylori*, transmission routes and recurrence of infection: state of the art. **Acta Bio Medica Atenei Parmensis**, v. 89, n. 8- S, p. 72–76, 17 dez. 2018.

KRZYŻEK, P.; BIERNAT, M. M.; GOŚCINIAK, G. Intensive formation of coccoid forms as a feature strongly associated with highly pathogenic *Helicobacter pylori* strains. **Folia Microbiologica**, v. 64, n. 3, p. 273–281, maio 2019.

KURBANOGLU, S.; OZKAN, S. A.; MERKOÇI, A. Nanomaterials-based enzyme electrochemical biosensors operating through inhibition for biosensing applications. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 89, p. 886–898, mar. 2017.

LAZANAS, A. CH.; PRODROMIDIS, M. I. Electrochemical Impedance Spectroscopy—A Tutorial. **ACS Measurement Science Au**, v. 3, n. 3, p. 162–193, 21 jun. 2023.

LIÉBANA, S.; DRAGO, G. A. Bioconjugation and stabilisation of biomolecules in biosensors. **Essays in Biochemistry**, v. 60, n. 1, p. 59–68, 30 jun. 2016.

MACHADO JÚNIOR, T. B. et al. AVALIAÇÃO DA RESPOSTA AO TRATAMENTO DE *Helicobacter pylori* NO MUNICÍPIO DE VALENÇA - RJ. v. 36, n. 1, p. 30–35, set. 2021.

MAGAR, H. S.; HASSAN, R. Y. A.; MULCHANDANI, A. Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS): Principles, Construction, and Biosensing Applications. **Sensors**, v. 21, n. 19, p. 6578, 1 out. 2021.

MALFERTHEINER, P. et al. *Helicobacter pylori* infection. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 9, n. 1, p. 19, 20 abr. 2023.

MANNOOR, M. S. et al. Graphene-based wireless bacteria detection on tooth enamel. **Nature Communications**, v. 3, n. 1, p. 763, 27 mar. 2012.

MAO, X. et al. Colonization of *Helicobacter pylori* in the oral cavity – an endless controversy? **Critical Reviews in Microbiology**, v. 47, n. 5, p. 612–629, 3 set. 2021.

MORALES, M. A.; HALPERN, J. M. Guide to Selecting a Biorecognition Element for Biosensors. **Bioconjugate Chemistry**, v. 29, n. 10, p. 3231–3239, 17 out. 2018.

NOSRATI, R. et al. *Helicobacter pylori* point-of-care diagnosis: Nano-scale biosensors and microfluidic systems. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 97, p. 428–444, dez. 2017.

Organização Mundial de Gastroenterologia. **Diretrizes mundiais da Organização Mundial de Gastroenterologia**. 2021. Disponível em: <https://www.worldgastroenterology.org/guidelines/helicobacter-pylori/helicobacter-pylori-portuguese>. Acesso em: out. 2023.

RAHMATI, Z. et al. An electrochemical immunosensor using SARS-CoV-2 spike protein-nickel hydroxide nanoparticles bio-conjugate modified SPCE for ultrasensitive detection of SARS-CoV-2 antibodies. **Microchemical Journal**, v. 170, p. 106718, nov. 2021.

RASMUSSEN, L. et al. Detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsies, saliva and dental plaques of dyspeptic patients from Marília, São Paulo, Brazil: presence of *vacA* and *cagA* genes. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 18, n. 2, p. 180–187, 2012.

RASMUSSEN, L. T. et al. *Helicobacter pylori* detection in gastric biopsies, saliva and dental plaque of Brazilian dyspeptic patients. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 3, p. 326–330, maio 2010.

RIMBARA, E.; SASATSU, M.; GRAHAM, D. Y. PCR Detection of *Helicobacter pylori* in Clinical Samples. Em: WILKS, M. (Ed.). **PCR Detection of Microbial Pathogens**. Methods in Molecular Biology. Totowa, NJ: Humana Press, 2013. v. 943p. 279–287.

RONKAINEN, N. J.; HALSALL, H. B.; HEINEMAN, W. R. Electrochemical biosensors. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 5, p. 1747, 2010.

SALU, O. B. et al. Saliva sample for detection of SARS-CoV-2: A possible alternative for mass testing. **PLOS ONE**, v. 17, n. 9, p. e0275201, 28 set. 2022.

SALVADOR, J.-P.; VILAPLANA, L.; MARCO, M.-P. Nanobody: outstanding features for diagnostic and therapeutic applications. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 411, n. 9, p. 1703–1713, mar. 2019.

SANTOS, A. et al. COVID-19 impedimetric biosensor based on polypyrrole nanotubes, nickel hydroxide and VHH antibody fragment: specific, sensitive, and rapid viral detection in saliva samples. **Materials Today Chemistry**, v. 30, p. 101597, jun. 2023.

SAXENA, K.; CHAUHAN, N.; JAIN, U. Advances in diagnosis of *Helicobacter pylori* through biosensors: Point of care devices. **Analytical Biochemistry**, v. 630, p. 114325, out. 2021.

SHARNDAMA, H. C.; MBA, I. E. *Helicobacter pylori*: an up-to-date overview on the virulence and pathogenesis mechanisms. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 33–50, mar. 2022.

SOHRABI, A. et al. Efficacy of Loop-Mediated Isothermal Amplification for *H. pylori* Detection as Point-of-Care Testing by Noninvasive Sampling. **Diagnostics**, v. 11, n. 9, p. 1538, 25 ago. 2021.

SONG, H.-Y.; LI, Y. Can eradication rate of gastric *Helicobacter pylori* be improved by killing oral *Helicobacter pylori*? **World Journal of Gastroenterology**, v. 19, n. 39, p. 6645, 2013.

SUNI, I. I. Substrate Materials for Biomolecular Immobilization within Electrochemical Biosensors. **Biosensors**, v. 11, n. 7, p. 239, 15 jul. 2021.

THALER, M.; LUPPA, P. B. Highly sensitive immunodiagnostics at the point of care employing alternative recognition elements and smartphones: hype, trend, or revolution? **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 411, n. 29, p. 7623–7635, nov. 2019.

WANG, Y. et al. A time-resolved fluorescent microsphere-lateral flow immunoassay strip assay with image visual analysis for quantitative detection of *Helicobacter pylori* in saliva. **Talanta**, v. 256, p. 124317, maio 2023a.

WANG, Y. et al. A visual detection assay for *Helicobacter pylori* in saliva based on recombinase-aided amplification and peptide nucleic acid-assisted split DNAzyme probes. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 396, p. 134582, dez. 2023b.

WONGSUWANLERT, M. et al. Prevalence and virulence factors of *Helicobacter pylori* isolated from oral cavity of non-disease, gastritis, and gastric cancer patients. **Journal of Dental Sciences**, p. S199179022300199X, jul. 2023.

World Gastroenterology Organisation Global Guideline: *Helicobacter pylori* in Developing Countries. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 45, n. 5, p. 383–388, maio 2011.

XU, C. et al. Virulence of *Helicobacter pylori* outer membrane proteins: an updated review. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 39, n. 10, p. 1821–1830, out. 2020.

YAMADA, R.; YAMAGUCHI, A.; SHIBASAKI, K. Detection and Analysis of *Helicobacter pylori* DNA in the Gastric Juice, Saliva, and Urine by Nested PCR. **Oral Science International**, v. 5, n. 1, p. 24–34, maio 2008.

YAMAOKA, Y. Mechanisms of disease: *Helicobacter pylori* virulence factors. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 7, n. 11, p. 629–641, nov. 2010.

YANG, B.-L. et al. A novel one-step *Helicobacter pylori* saliva antigen test. **Journal of the Chinese Medical Association**, v. 78, n. 2, p. 96–100, fev. 2015a.

YE, J. et al. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. **BMC Bioinformatics**, v. 13, n. 1, p. 134, dez. 2012.

YEE, K. C. et al. A Screening Trial of *Helicobacter pylori*-Specific Antigen Tests in Saliva to Identify an Oral Infection. **Digestion**, v. 87, n. 3, p. 163–169, 2013.

YU, M. Application of Saliva Test Cassette to detect oral infection with *Helicobacter pylori* among college students in Yancheng. **Pakistan Journal of Medical Sciences**, v. 31, n. 5, 16 set. 2015.

ZHANG, X. et al. A CRISPR/Cas12a-assisted array for *Helicobacter pylori* DNA analysis in saliva. **Analytica Chimica Acta**, v. 1239, p. 340736, jan. 2023.

ZHAO, Y. et al. Establishment of a TaqMan-MGB probe multiplex real-time PCR system for one-step levofloxacin and clarithromycin resistant *Helicobacter pylori* detection. **Journal of Microbiological Methods**, v. 192, p. 106393, jan. 2022.