



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS- GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**DESENVOLVIMENTO DE PLATAFORMA NANOESTRUTURADA
PARA BIODETECÇÃO DE *LEISHMANIA INFANTUM***

MARIA FLÁVIA KAROLINE DOS SANTOS GARCIA

RECIFE

2015

MARIA FLÁVIA KAROLINE DOS SANTOS GARCIA

**DESENVOLVIMENTO DE PLATAFORMA NANOESTRUTURADA
PARA BIODETECÇÃO DE *LEISHMANIA INFANTUM***

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Maria Danielly Lima de Oliveira

COORIENTADOR: Prof. Dr. César Augusto Souza de Andrade

RECIFE

2015

MARIA FLÁVIA KAROLINE DOS SANTOS GARCIA

**DESENVOLVIMENTO DE PLATAFORMA NANOESTRUTURADA
PARA BIODETECÇÃO DE *LEISHMANIA INFANTUM***

Dissertação apresentada para o
cumprimento das exigências para
obtenção do título de Mestre em
Ciências Biológicas pela Universidade
Federal de Pernambuco

Catálogo na Fonte:

Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Garcia, Maria Flávia Karoline dos Santos

Desenvolvimento de plataforma nanoestruturada para biodeteção de *Leishmania Infantum* / Maria Flávia Karoline dos Santos Garcia. – Recife: O Autor, 2015.

71 f.: il.

Orientadores: Maria Danielly Lima de Oliveira, César Augusto Souza de Andrade

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Ciências Biológicas, 2015.

Inclui referências

1. Leishmaniose Visceral 2. Diagnóstico I. Oliveira, Maria Danielly Lima de II. Andrade, César Augusto Souza de (coorient.) III. Título.

616.9364

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2015-244

Aprovada em 07/08/2015

BANCA EXAMINADORA:

TITULARES:

Profa. Maria Danielly Lima de Oliveira (Departamento de Bioquímica/UFPE) –
Orientadora

Prof. Dr. César Augusto Souza de Andrade (Departamento de
Bioquímica/UFPE)- 1º examinador

Prof. Dr. Kleber Gonçalves Bezerra (Departamento de Engenharia
Mecânica/UFPE)- 2º examinador

SUPLENTE:

Profa. Maira Galdino da Rocha Pitta (Departamento de Bioquímica/UFPE)

Profa. Márcia Vanusa da Silva (Departamento de Bioquímica/UFPE)

Aos meus pais, Waltrupes e Ednalva,

... por todo carinho, amor, paciência...

...dedico.

AGRADECIMENTOS

A Ti Senhor toda honra e toda glória. Deus tu que sempre estivestes comigo em todos os momentos da minha vida, quando pensei em fracassar sempre me mostrastes o melhor caminho a ser seguido. Obrigada por me dar forças para que eu chegasse até aqui!

Aos meus pais Waltrupes e Ednalva que sempre me apoiaram em todos os momentos da minha vida, e por serem os responsáveis de tudo que sou hoje, vocês me ensinaram conceitos que levarei por todos os caminhos que eu percorrer, obrigada pelo exemplo de pais que vocês são, por todo carinho, compreensão, cuidado, pelas várias ligações diárias. Obrigada por tudo, Amo vocês!

A todos os meus familiares (tios, primos) por todo apoio direto ou indiretamente, vocês têm um papel de grande importância na minha vida e formação. Especialmente Tia Dora, por todo carinho e cuidado que sempre tiveste comigo.

Ao meu namorado Marcos, por toda paciência, carinho nesse período de tanta importância na minha vida, obrigada por estar sempre comigo!

À minha orientadora Prof^a Maria Danielly, pela sua forma de orientar, ensinar, ajudar, por acreditar em mim, por toda paciência, conselhos, confiança e disponibilidade. Todo esse apoio foi fundamental para que eu chegasse até aqui.

Ao meu coorientador Prof. Cesar Andrade, primeiramente pela oportunidade de fazer parte do grupo de Biodispositivos nanoestruturados, por todo aprendizado nesse período, por estar sempre presente, tirando dúvidas, mostrando um melhor direcionamento nos experimentos.

Ao quarteto inseparável Giselle, Maurília e Karen, agradeço a Deus por existir pessoas na minha vida igual a vocês, por todos os momentos que dividimos juntas, experimentos no laboratório, congressos, viagens, conselhos e por tudo. Obrigada!

Aos alunos de Iniciação Científica Jair e Daliane, a participação de vocês foi fundamental para que esse trabalho fosse concluído.

Às minhas amigas Kalline e Juliana que sempre compartilhamos de muitos momentos juntas no laboratório e no dia a dia. Obrigada por sempre estarem comigo!

Aos meus amigos do laboratório, Thaynara, Gabriel, Rafael, Gustavo, Elton, Estefani, Sandra, Felipe, Raiza, Cheley, Erico, Thays, obrigada por toda nossa convivência diária, conversas, brincadeiras, ajuda.

À minha amiga Leila, que vivenciei comigo essa importante fase da minha vida, principalmente essa reta final, obrigada pelas palavras de consolo, pela paciência e pela sua amizade.

ÀCAPES pelo apoio Financeiro.

Aos professores, colegas e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica.

E a todos que não citei aqui mas tiveram uma grande importância no desenvolvimento deste trabalho!

Obrigado!

“Ainda que eu andasse pelo vale da morte, não temeria mal algum, porque tu estás comigo; a tua vara e o teu cajado me consolam.”

Salmo 23:4

RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE PLATAFORMA NANOESTRUTURADA PARA BIODETECCÃO DE *LEISHMANIA INFANTUM*

Leishmaniose visceral é uma zoonose em crescente expansão no Brasil, causada pela *Leishmania infantum chagasi*, tendo o cão como principal reservatório em ambiente urbano, mantendo o ciclo de transmissão nesses locais. Esta enfermidade é transmitida pelo flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*. A síntese de novos materiais híbridos, como o nanocompósito de ouro e polianilina (PANI) tem permitido a obtenção de sistemas com propriedades físico-químicas destacadas. Estes compósitos híbridos destacam-se porque são formados da junção de dois ou mais materiais de propriedades diferentes, formando um com melhores propriedades. A modificação da superfície do eletrodo com compósitos híbridos tem levado ao desenvolvimento de sensores eletroquímicos com extrema eficiência. O objetivo deste trabalho foi a avaliação voltamétrica e impedimétrica de um sistema nanoestruturado baseado em PANI-AuNps na presença de $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ (1:1), 10 mM, como par redox, para o diagnóstico de *Leishmania infantum*. Posteriormente o sistema foi avaliado utilizando-se uma sequência primer específico para *L. infantum* podendo-se assim avaliar a hibridização da fita complementar. As etapas de modificação do eletrodo são observadas na Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) na faixa de frequência de 100 mHz a 100 KHz, através do aumento gradativo do diâmetro do semicírculo de Cole-Cole após a adição dos componentes do sistema. Portanto, foi observado um aumento da resistência de transferência de carga (R_{TC}) devido à adsorção destes componentes. O processo de interação do primer-genoma da *L. Infantum* foi evidenciado através do aumento da R_{TC} devido ao fenômeno de hibridização das fitas complementares, obtendo como resposta um baixo limite de detecção 0.01 pg mL^{-1} . Como esperado, respostas similares foram observadas através da técnica de Voltametria cíclica (VC) na faixa de varredura -0,2V a 0,7V, onde o eletrodo de ouro mostra correntes de pico anódicas e catódicas bem definidas. Posteriormente, após adsorção do compósito PANIAuNps há redução das correntes, sendo mais expressa após adsorção do primer e do genoma. Além das análises de EIE e VC, utilizamos a MEV onde visualizamos os aspectos

mais detalhados da modificação da superfície do sistema. Nossos resultados indicaram uma boa sensibilidade, e desta forma o sistema sensor desenvolvido neste trabalho é uma alternativa viável para a biodeteção de leishmaniose.

PALAVRAS-CHAVES: Leishmaniose, Biossensor, Espectroscopia de Impedância, Voltametria Cíclica, Compósitos Híbridos.

ABSTRACT

DEVELOPMENT PLATFORM NANOSTRUCTURED FOR BIODETECTION *LEISHMANIA CHAGASI*

Visceral leishmaniasis is a zoonosis becoming increasingly widespread in Brazil, caused by *Leishmania infantum chagasi*, with the dog as the main reservoir in urban environment while maintaining the transmission cycle in these locations. This disease is transmitted by the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. The synthesis of new hybrid materials such as polyaniline (PANI) associated with gold nanoparticles (AuNPs) has allowed the obtaining of systems with physicochemical properties highlighted. These hybrid composite is distinguished because they are formed from the joining of two or more different materials properties, forming with better properties. The electrode surface modification with hybrid composites has led to the development of electrochemical sensors with extreme efficiency. The objective of this work was the voltammetric evaluation and prevent metric of a nanostructured system based on PANI-AuNPs in the presence of K₃ [Fe (CN) ₆ K₄ [Fe (CN) ₆] (1: 1), 10 mM, as redox couple for the diagnosis of *Leishmania infantum*. Subsequently the system was carried out by using a sequence specific primer for *L. infantum* can be thus evaluate the complementary strand hybridization. The modification steps are observed in the electrode electrochemical impedance spectroscopy (EIS) in the frequency range of 100 mHz to 100 KHz, through the gradual increase of the Cole-Cole semicircle diameter after the addition of system components. Therefore, an increase in charge transfer resistance was observed (RTC) due to the adsorption of these components. The interaction primer-genome of *L. infantum* was evidenced by increasing the RTC due to the phenomenon of hybridization of complementary strands, obtaining as a reply lower detection limit of 0.01 pg ml⁻¹. As expected, similar responses were observed by cyclic voltammetry technique (VC) in the scan range -0,2V to 0.7V, where the gold electrode shows peak currents anodic and cathodic well defined. Subsequently, after adsorption of the composite PANIAuNps no reduction in current, it is more expressed after adsorption of the primer and the genome. In addition to the analysis of EIS and VC, we use the SEM where we visualize the most detailed aspects of system surface

modification. Our results indicated good sensitivity, and thus the sensor system developed in this work is a viable alternative for bio-detection Leishmaniasis.

KEYWORDS: Leishmaniasis, Biosensor, Impedance, Voltammetry, Scanning, Gold nanoparticles, Polyaniline.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cerâmica pré--Inca indicando lesões causadoras de deformações cutâneas da face em caso de leishmaniose-----	4
Figura 2. Mosquito vetor- popularmente conhecido mosquito palha.-----	5
Figura 3. Ciclo do flebotomíneo e suas formas promastigota e amastigota. -----	6
Figura 4. Representação distribuição de casos autóctones de Leishmaniose Visceral segundo município-----	8
Figura 5. Esquema geral de um biossensor. O analito é reconhecido pelo biorreceptor. Interação resultante é transformada num sinal elétrico pelo transdutor e registrado através do processamento de dados-----	11
Figura 6. Representação classificação dos transdutores-----	13
Figura 7. Esquema ilustrativo dos quatro tipos básicos de métodos de imobilização enzimáticos: a) adsorção, b) encapsulação, c) ligação covalente e (d) ligação covalente cruzada.-----	16
Figura 8. Dimensões representativas de algumas espécies típicas, em suas várias escalas-----	17
Figura 9. Estrutura geral da Polianilina (PANI), mostrando as unidades reduzidas (ganha elétrons) e oxidadas (perde elétrons)-----	19
Figura 10. Os estados de oxidação mais importantes da polianilina: leucoesmeraldina, esmeraldina (isolante e condutora) e pernigranilina-----	20
Figura 11. Voltamograma cíclico-----	22
Figura 12. Formas de aplicação do potencial para a voltametria cíclica: a) potencial com varredura linear e b) potencial do tipo escada-----	23
Figura 13. Circuito do tipo Randles (no topo) e sua resposta idealizada no plano de impedância complexa-----	25

Figura 14.Desenho esquemático dos componentes básicos do MEV -----27

Figura 15.Célula convencional de três eletrodos-----31

“Biosensor for leishmania infantum genome based on polyaniline-gold nanoparticles hybrid composite”.

Figure 1.Schematic representation of the biosensor.

Figure 2.SEM topographic images of PANIAuNp (a), LiP-PANIAuNp (b), LiG-LiP-PANIAuNp (c) and Negative Genome-LiP-PANIAuNp (d).

Figure 3. Cyclic voltammograms of the electrode at different stages: Probe immobilization (a), steps of electrode modification (b) and evaluation of LiP-PANIAuNp at different genome concentrations (c). Supporting electrolyte 10mM $K_4[Fe(CN)_6]^{4-}/K_3[Fe(CN)_6]^{3-}$ 1:1 in 10 mM PBS pH 7.4 solution; scan rate of 50 $mV.s^{-1}$.

Figure 4. Nyquist plot of the electrode at different stages (a); Bare gold electrode (●), PANIAuNp (●) and LiP-PANIAuNp (●), in presence of the redox pair of $K_4[Fe(CN)_6]^{4-}/K_3[Fe(CN)_6]^{3-}$ 1:1 in 10 mM PBS pH 7.4 solution. Evaluation of LiP-PANIAuNp at different genome concentrations (b); Modified Randles circuit (c) and circuit elements; R_{Ω} - electrolyte resistance, Q - constant phase element, R_{CT} – charge transfer resistance and Z_w - Warburg element. $\Delta R_{CT}\%$ for the systems that corresponded to the LiP-PANIAuNp-L. infantum genome at different concentrations (d).

Figure 5. Cyclic voltammograms (a) and Nyquist plots (b) demonstrating canine serum evaluation by LiP-PANIAuNp system at different concentrations (0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ – 10 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$). Supporting electrolyte 10mM $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ 1:1 in 10 mM PBS pH 7.4 solution; scan rate of 50 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$. $\Delta R_{\text{CT}}\%$ (c) for the systems that corresponded to the LiP-PANIAuNp system for serum recognition.

LISTAS DE TABELAS

“Biosensor for leishmania infantum genome based on polyaniline-gold nanoparticles hybrid composite”.

Table 1: Values of the equivalent circuit elements from fitted impedance results.

Table 2: Values of the equivalent circuit elements from fitted impedance results for CS recognition.

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PANIAuNps	Compósito híbrido de polianilina e nanopartícula de ouro
C	Capacitância
C_{dl}	Capacitância da dupla camada
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês desoxyribonucleic acid)
E	Potencial
EIE	Espectroscopia de Impedância Eletroquímica
i_{pa}	Corrente de pico anódica (A)
i_{pc}	Corrente de pico catódica
LV	Leishmaniose Visceral
LiG	Genoma
LiP	Primer
PANI	Polianilina
PCR	Reação em cadeia da Polimerase (do inglês polymerase chain reaction)
RNA	Ácido ribonucleico (do inglês ribonucleic acid)
R_{ct}	Resistência de transferência de elétron (Ω)
$\Delta R_{ct}\%$	Percentual relativo da variação à transferência de carga
SEM	Microscopia eletrônica de varredura (do inglês scanning electron microscopy)
VC	Voltametria cíclica
Z	Impedância (Ω)

Z_f Impedância faradaica (Ω)

Z_{im} Parte Imaginária ou componente capacitiva (Ω)

Z_{re} Parte Real ou componente resistiva (Ω)

Z_w Impedância de Warburg

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Por cento
3'	Três linha
5'	Cinco linha
μ	Micro
Ω	Ohm
V	Volts
pg	Picograma

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Histórico	4
2.2. Agente etiológico e transmissão	4
2.3. Epidemiologia	6
2.4. Métodos diagnóstico e tratamento	8
2.5. Biossensores	10
2.5.1. Classificação dos biossensores	11
2.6. Genossensores	14
2.7. Modificações de superfícies sensoras	16
2.7.1. Nanopartículas	16
2.7.2. Polianilina e nanopartículas de ouro	17
2.8. Métodos eletroquímicos	20
2.8.1. Voltametria cíclica	20
2.8.2. Espectroscopia de impedância eletroquímica	22
2.9. Análise morfológica	25
2.9.1. Microscopia eletrônica de varredura	25
3. JUSTIFICATIVA	27
4. OBJETIVOS	28
4.1. Objetivo geral	28
4.2. Objetivos específicos	28
5. METODOLOGIA	29
5.1. Materiais	29
5.2. Equipamentos	29
5.3. Síntese das nanopartículas (PANIAuNps)	32
5.4. Preparação do sistema LiP-PANIAuNps	32
5.5. Análise do sistema LiG-LiP-PANIAuNps frente ao material coletado de cães contaminados	31
5.6. Medidas eletroquímicas	31
5.7. Caracterização morfológica	31
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
7. ARTIGO	40

8. CONCLUSÕES	65
9. PERSPECTIVAS FUTURAS	66

1. INTRODUÇÃO

A *Leishmania* é um gênero de protozoários da família Trypanosomatidae, que inclui os parasitas causadores das leishmanioses. A leishmaniose visceral (LV) é transmitida ao homem por insetos vetores ou transmissores, conhecidos como flebotomíneos. A transmissão acontece quando uma fêmea infectada passa o protozoário a uma vítima sem a infecção, enquanto se alimenta de seu sangue [1]. É causada por espécies do gênero *Leishmania*, pertencentes ao complexo *donovani*. São reconhecidas três espécies como agentes etiológicos da doença destacando-se a *Leishmania infantum* [2]. É uma zoonose largamente disseminada, que representa um problema sério de saúde pública com várias manifestações clínicas que dependem da espécie [3]. Além disso, a leishmaniose destaca-se como a segunda causa de mortalidade dentre doenças negligenciadas [4].

O número de cães infectados constitui um problema na transmissão da infecção para humanos [5]. Aspectos clínicos para o diagnóstico são de extrema importância devido à presença de sinais e sintomas inespecíficos em oligossintomáticos [6].

Os exames parasitológicos são considerados métodos de referência no diagnóstico da LV, ainda que requeiram procedimentos invasivos e a necessidade de laboratoristas experientes. São ainda procedimentos laboriosos e que não apresenta sensibilidade ideal. A confirmação de LV pode ser feita pela demonstração direta em esfregaços ou pelo cultivo do parasito obtido de baço, fígado, medula óssea ou linfonodos [7]. A especificidade dos métodos parasitológicos é de cerca de 100%, mas a sensibilidade é bastante variável, pois a distribuição dos parasitas não é homogênea no tecido [8] e varia de 95 a 98% quando se utiliza o aspirado de baço, de 76 a 91% para o de fígado, de 52 a 89% para o de medula óssea e 52 a 69% para o de linfonodos [8].

Os aspectos clínicos para o diagnóstico de LV são de extrema importância devido à presença de sinais e sintomas inespecíficos em oligossintomáticos [6]. Além disso, vários testes como o ELISA, imunofluorescência e ensaios imunocromatográficos destinam-se para o diagnóstico da LV. No entanto, os testes supracitados apresentam como principais limitações a reação cruzada com outras parasitoses, e baixa sensibilidade na detecção de casos assintomáticos [6]. Desta forma, o desenvolvimento de novas ferramentas de detecção da *L. chagasi* de forma rápida e sensível é de extrema importância, destacando-se o uso de compósitos híbridos para o desenvolvimento de biossensores eletroquímicos impedimétricos e voltamétricos.

Os biossensores eletroquímicos de DNA baseados na hibridização de ácido nucléico tem recebido uma considerável atenção devido a sua potencial aplicação para o diagnóstico de várias doenças [9]. Para construção de biossensores eletroquímicos, é de extrema importância imobilizar os elementos de reconhecimento sobre o eletrodo para fornecer os sítios de reconhecimento molecular, associado a isso vem sendo utilizados nanomateriais para facilitar a detecção do analito de interesse com sensibilidade [10].

A modificação da superfície do eletrodo com compósitos híbridos tem levado ao desenvolvimento de vários sensores eletroquímicos [11]. Em particular, as nanopartículas de ouro, têm sido intensamente investigadas para o desenvolvimento de eletrodos biossensíveis, entre suas propriedades pode ser observada boa resistência mecânica, alta condutividade elétrica e biocompatibilidade com materiais biológicos. [12]. Além desse uso destacam-se os polímeros condutores, entre eles a polianilina, fácil síntese e boa estabilidade química em condições ambientais [13]. A união da polianilina e partículas de ouro (PANIAuNps) demonstram propriedades elétricas e ópticas diferenciadas [14] que os tornam elementos essenciais para o desenvolvimento de sistemas biossensíveis [15].

O uso de PANIAuNps advém da possibilidade do uso deste sistema para imobilização de ácidos nucléicos na superfície do eletrodo por meio de interação eletrostática entre os grupos fosfatos do ácido nucléico e a polianilina. Desta forma, o compósito híbrido PANIAuNps demonstra ser um

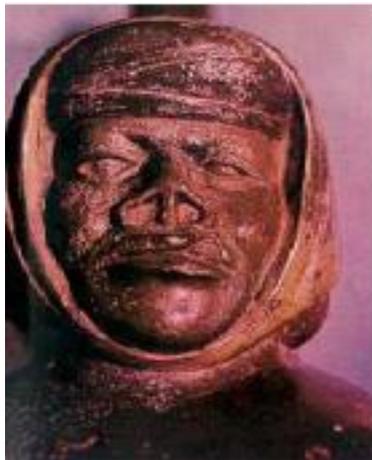
excelente candidato como matriz para o desenvolvimento de um genossensor para *L. infantum*.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Histórico

A leishmaniose caracteriza-se por ser uma doença que acomete algumas regiões do corpo podendo causar deformações. Este fato é notado desde os primeiros anos antes de Cristo, onde já era possível encontrar vestígios de doenças humanas que causavam alterações na face. As cerâmicas das civilizações pré-Incas do Peru e Equador já faziam alusão à lesões proporcionadas pela leishmaniose (Figura 1). Outros achados fazem referência a textos documentados do período Inca, séculos XV e XVI. Todos esses achados indicam que a leishmaniose faria parte de um grupo de doenças bastante antiga, que afeta a humanidade e há pouco tempo recebeu esta denominação [16].

Figura 1. Cerâmica pré--Inca indicando lesões causadoras de deformações cutâneas da face em caso de leishmaniose. Fonte: <http://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/3954>.



2.2. Agente etiológico e Transmissão

A *Leishmania* é um gênero de protozoários da família Trypanosomatidae, que inclui os parasitas causadores das leishmanioses. A leishmaniose visceral, ou calazar, é uma doença transmitida pelo mosquito-palha (*Lutzomyia longipalpis*) (Figura 2), que, ao picar, introduz na circulação

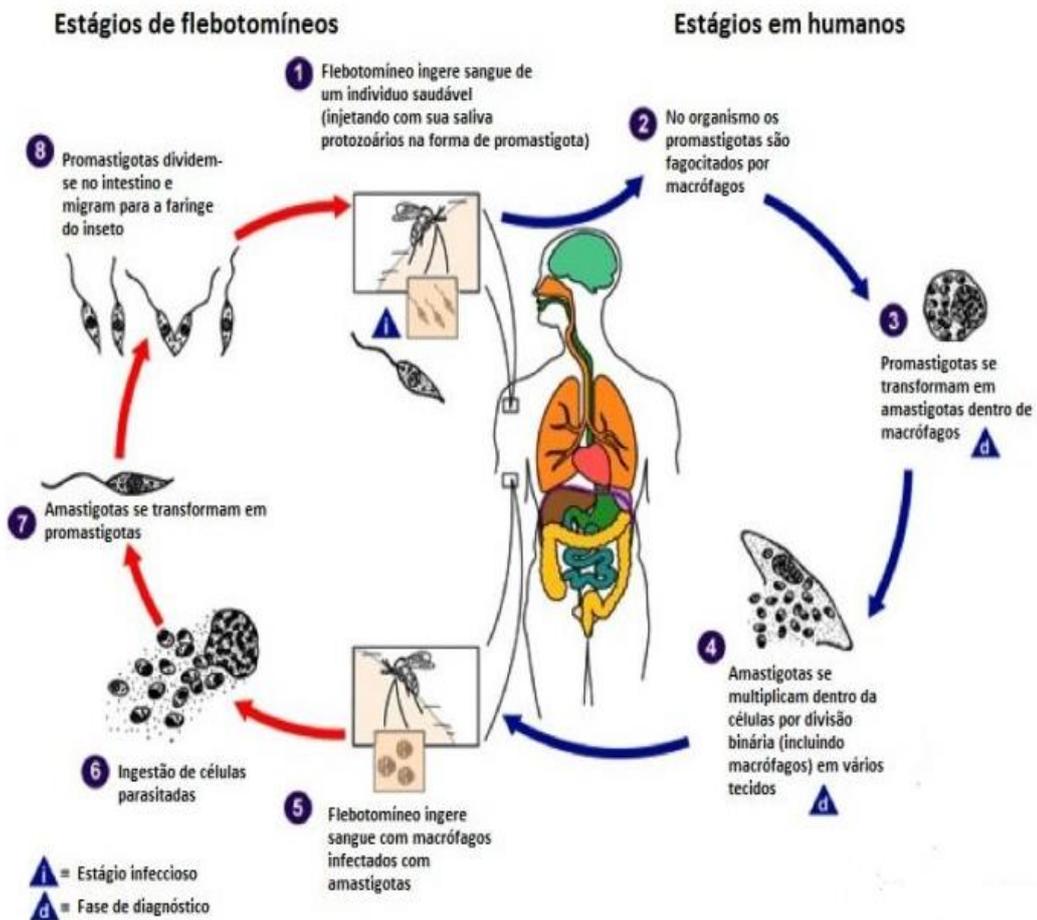
do hospedeiro o protozoário *Leishmania chagasi* também denominado *Leishmania infantum*. (Figura 3) [17].

Figura 2. Mosquito vetor- popularmente conhecido mosquito palha. Fonte: <http://www.cristofoli.com>.



Esses protozoários são responsáveis por um amplo espectro de doenças tropicais e subtropicais do homem e de outros animais. As principais formas encontradas durante o ciclo de vida (Figura 3) são a forma flagelada ou promastigota e forma aflagelada ou amastigota [18]. A transmissão acontece quando uma fêmea infectada passa o protozoário a uma vítima sem a infecção, enquanto se alimenta de seu sangue [19].

Figura 3. Ciclo do flebotomíneo e suas formas promastigota e amastigota. Fonte: <http://www.med.sc.edu/parasitologia>.



2.3. Epidemiologia

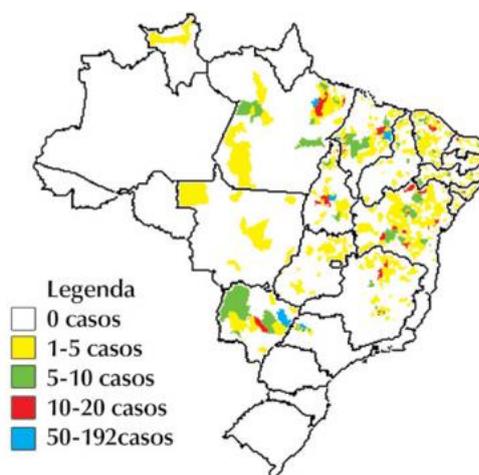
A Leishmaniose atinge mais de 98 países em todo mundo. É considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS), uma das doenças que mais causa impacto aos cofres públicos mundiais. É uma doença debilitante, que fica atrás apenas da Malária e Tuberculose [20]. Estima-se que 12-15 milhões de pessoas estão infectadas no mundo e aproximadamente 1,5-2 milhões de novos casos por ano. Desses 500.000 casos são de Leishmaniose Visceral (LV) e 1.500.000 de Leishmaniose cutânea. [21]. A Leishmaniose cutânea demonstra uma tendência de regressão da patologia naturalmente, deixando cicatrizar no local, em contrapartida a Leishmaniose Visceral quando não tratada é causa de 59.000 mortes anuais (35.000 homens

e 24.000 mulheres). O primeiro caso descrito de LV no Brasil ocorreu em 1934, quando foram encontradas amastigotas de *Leishmania* em cortes histológicos de fígado de pessoas que morreram com suspeita de febre amarela. Após passados 20 anos foi registrado o primeiro surto da doença em Sobral, no Ceará [22]. Já em meados dos anos 80, constatou-se uma transformação drástica na distribuição geográfica da LV. A Leishmaniose avançou inclusive para as periferias de grandes cidades, onde antes era apenas restrita a alguns lugares principalmente do Nordeste. A doença é mais frequente em menores de 10 anos (58%) e o sexo masculino é proporcionalmente o mais afetado. Crianças têm uma susceptibilidade diante do sistema imunológico mais fragilizado e outros fatores como desnutrição que são comuns em áreas endêmicas. Os cães são bastante susceptíveis à infecção por LV e devido à sua estreita relação com o homem, são considerados os reservatórios de maior importância para a transmissão da doença ao ser humano [23].

Os dados epidemiológicos dos últimos dez anos revelam a urbanização da LV, destacando-se os surtos ocorridos no Rio de Janeiro, Belo Horizonte, Araçatuba, Santarém, Corumbá, Teresina, Natal, São Luís, Fortaleza, Camaçari e mais recentemente as epidemias ocorridas nos municípios de Três Lagoas, Campo Grande e Palmas. As áreas de transmissão da doença no Brasil estão representadas na (Figura 4) [24].

A maioria dos casos é de infecção assintomática ou que desenvolvem sintomas moderados ou transitórios como diarreia, tosse seca, adinamia, febrícula, sudorese e discreta hepatoesplenomegalia, que podem evoluir ou não para a forma clássica da doença. O quadro clássico consiste de febre, hepatoesplenomegalia, com esplenomegalia volumosa, perda de peso, tosse, diarreia, dor e distensão abdominal. Icterícia e envolvimento renal têm sido descritos. Na fase mais tardia da doença, os pacientes podem desenvolver edema e ascite [25].

Figura 4. Distribuição de casos autóctones de LV segundo município. Fonte: <http://www.saude.mt.gov.br/upload/documento/50/manual-leishmaniose-%5B50-151009-SES-MT%5D.pdf>.



2.4. Métodos de diagnóstico e tratamento

O diagnóstico da Leishmaniose no Sistema Único de Saúde baseia-se principalmente em exames imunológicos e parasitológicos. Dentre os quais podemos destacar:

- Diagnóstico imunológico- Pesquisa de anticorpos contra *Leishmania*.
- Ensaio imunoenzimático (ELISA): O ELISA é considerado método de triagem. Sua sensibilidade varia de 71 a 100% e sua especificidade entre 85 e 100%; os fatores que influenciam estas variáveis são o antígeno utilizado (bruto ou recombinante) e o protocolo padrão (tempo de incubação e tipo de microplaca utilizada). Uma limitação desse teste é a reação cruzada com outros parasitas como o *Trypanosoma cruzi* [26].
- Imunofluorescência indireta (RIFI): É reconhecido como “padrão-ouro”, tanto para LV humana quanto canina. Apesar de apresentar menor sensibilidade e especificidade que o ELISA, tem sido o método mais comumente utilizado. [27].

- Reação em Cadeia da Polimerase (PCR): Técnica baseada na amplificação de fragmentos de DNA. A utilização da PCR permite a detecção do parasita com o uso de sondas específicas de forma não invasiva. Trata-se de uma técnica ainda restrita por ser cara, necessitar de profissionais bem capacitados, possibilidade de contaminação das amostras entre outros fatores [28].
- Intradermorreação de Reação de Montenegro (IDRM): consiste na inoculação intradérmica de antígeno padronizado (leishmania), com leitura após 48 a 72 horas. De acordo com Thomé (1999), a mesma não apresenta bons resultados para o diagnóstico da LVC. Ela tem sido usada, porém necessitando de estudos sobre possíveis reações cruzadas [29].
- Diagnóstico parasitológico: busca de formas amastigotas do parasito [30].
- Exame direto: É realizada a busca de formas amastigotas através de amostras de linfonodo, medula óssea etc, através das colorações de Giemsa ou Wright, Leishman, Panótico. Nem sempre o parasita é encontrado, pois depende da distribuição na lâmina, da coleta, de infecções secundárias etc. Dentre as limitações do método, encontra-se a probabilidade de diagnóstico falso-negativo em infecções recentes [31].
- Isolamento em meio de cultura (in vitro): Inoculação do material em meio de cultura contendo ágar, NaCl, água destilada e sangue de coelho retirado da punção aspirativa da lesão ou da biópsia triturada. Método com baixa sensibilidade porém melhor do que o exame direto. O controle da temperatura e demora do diagnóstico, são algumas das limitações desse método [32].

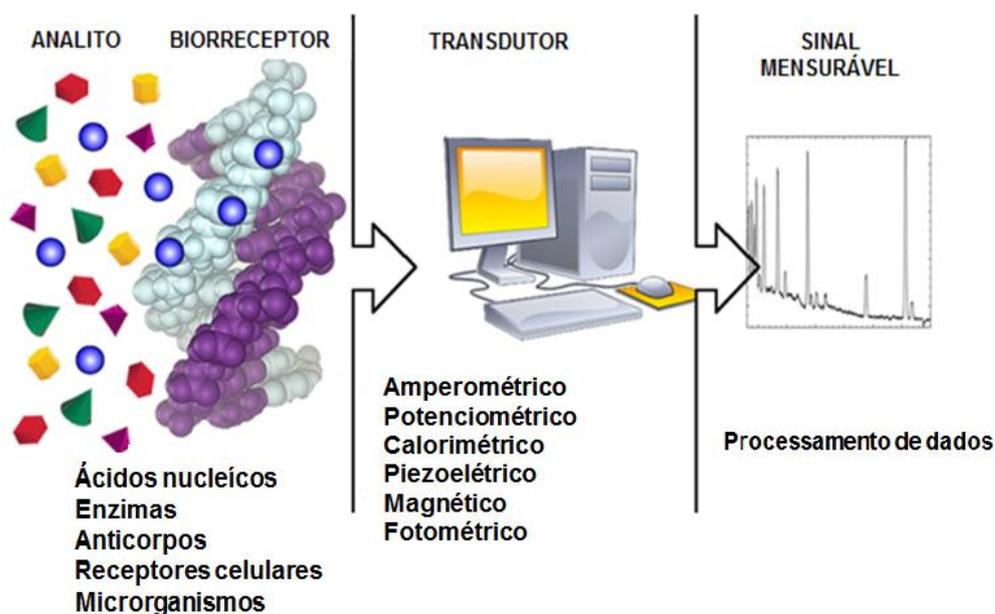
No Brasil, os medicamentos utilizados para o tratamento de LV são o antimonial pentavalente e anfotericina B. A escolha de cada um deles deverá considerar a faixa etária, presença de gravidez, comorbidades e o perfil de toxicidade das drogas. Todos os medicamentos citados, tanto para o tratamento da LV quanto da LTA, são tóxicos e podem apresentar eventos adversos [33].

Desta forma, torna-se necessário o desenvolvimento de novas ferramentas de diagnóstico, como os biossensores, para Leishmaniose com o intuito de favorecer uma melhor estratégia de tratamento.

2.5. Biossensores

Biossensores são dispositivos que utilizam componentes biológicos como elementos de reconhecimento de outras moléculas biológicas, como vírus, bactérias, fungos ou mesmo células cancerígenas [34]. Dentre os elementos de reconhecimento biológicos utilizados na construção de biossensores, destacam-se: sequências de DNA ou RNA, enzimas, antígeno, anticorpo, organelas, peptídeos, organismos e células [35]. Assim, um biossensor combina a especificidade de um componente biológico ativo, para o analito de interesse, com a sensibilidade de um transdutor que tem como função a tradução da informação a partir de uma informação bioquímica, geralmente em concentração do analito, em um sinal de saída, químico ou físico, com uma sensibilidade definida. Sendo assim, seu principal objetivo é fornecer um elevado grau de seletividade para um determinado analito (Figura 5) [36].

Figura 5. Esquema geral de um biossensor. O analito é reconhecido pelo biorreceptor. Interação resultante é transformada num sinal elétrico pelo transdutor e registrado através do processamento de dados. Fonte: <http://www.infobibos.com>.



Nos últimos anos estudos comprovam que o uso dos biossensores traz uma série de vantagens [37], [38]. São altamente sensíveis e seletivos, relativamente fáceis em termos de desenvolvimento, além de acessíveis, baixo custo, necessidade de pouca amostra, análise direta, prontos para uso. [39].

2.5.1. Classificação dos biossensores:

Os biossensores podem ser classificados de acordo com o elemento biológico de reconhecimento ou transdutor.

Biossensores quanto ao elemento de reconhecimento biológico

Dentre os tipos de sensores que seguem esta classificação podemos destacar os biossensores enzimáticos, imunossensores, os baseados em células, os genossensores e aptassensores.

Os biossensores enzimáticos, utilizam enzimas como elementos bioreceptores, como é o caso da glicose oxidase utilizada na mensuração da glicose no sangue. Além do uso da glicose oxidase, várias outras enzimas são utilizadas na construção de biossensores, tais como a urease, penicilinase e álcool desidrogenase [40].

Os imunossensores são baseados na reação imunológica, sendo que o antígeno ou anticorpo é imobilizado na superfície do transdutor. Assim, diversos tipos de imunossensores podem ser construídos, de acordo com o tipo de transdutor empregado [41].

Os biossensores celulares utilizam microorganismos, especialmente, para o monitoramento ambiental de poluentes. As células são incorporadas à superfície de um eletrodo, sendo o princípio de operação muito semelhante aos biossensores enzimáticos. Contudo, apresentam custo reduzido, maior atividade catalítica e estabilidade [42].

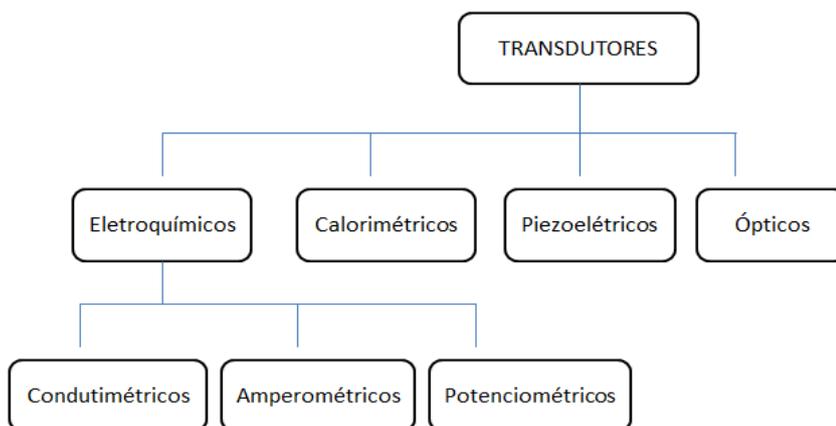
Já os genossensores são biossensores eletroquímicos de DNA ou RNA, baseados na hibridação do ácido nucleico [43].

Os aptasensores são biossensores que utilizam aptâmeros como elemento de biorechecimento. Os aptâmeros são sequências de DNA ou RNA [44].

Biossensores quanto ao sistema transdutor

Os biossensores podem ser classificados quanto ao sistema transdutor em eletroquímicos, condutimétricos, amperométricos, potenciométricos, colorimétricos, piezoelétricos e ópticos (Figura 6).

Figura 6. Classificação dos transdutores. Fonte: <http://www.repositorio.ipl.pt/bitstream/10400.21/318/1/Dissertacao.pdf>.



Os biossensores eletroquímicos são os biossensores mais comumente utilizados nos testes de monitoramento e diagnóstico em análises clínicas. Transformam o efeito de interações eletroquímicas entre analito e eletrodo em sinais elétricos. Esses dispositivos envolvem as técnicas de potenciometria, voltametria e espectroscopia de impedância, entre outras [45].

Os biossensores condutimétricos medem as alterações na condutância entre um par de eletrodos metálicos como consequência da ação do elemento biológico. A condutividade é a função linear da concentração iônica, porém, não é específica para um dado tipo iônico [46].

Os biossensores amperométricos medem as alterações na corrente do eletrodo de trabalho devido à oxidação direta dos produtos de uma reação biológica. Nesta técnica é aplicado um potencial fixo suficiente para efetivação de um processo redox na célula eletroquímica. E para as análises quantitativas, determina-se que quanto menor e mais próximo de zero for o potencial, menores serão os problemas relacionados a interferentes. Sendo este conceito também aplicável aos biossensores voltamétricos. Uma célula amperométrica pode conter dois ou três eletrodos [46].

Os potenciométricos baseiam-se na medição dos potenciais do eletrodo de trabalho em relação a um eléctrodo de referência. Como exemplo, os eletrodos íons seletivos.

Os biossensores calorimétricos detectam substratos baseados no calor envolvido nas reações bioquímicas do analito com uma substância biológica ativa adequada, como uma enzima. Não podem ser utilizados em sistemas que apresentem trocas de calor muito baixas. A perda do calor diminui a sensibilidade dos biossensores calorimétricos [47]. Além dos biossensores já citados destacam-se também os piezoelétricos e os ópticos.

Os piezoelétricos transformam variações de massa de uma determinada superfície em sinais elétricos. Técnicas de transdução utilizando microbalança de cristal de quartzo (QCM) e microscopia de força atômica (AFM) são utilizadas nesse tipo de sensor [48].

Os ópticos são baseados no princípio de transdução como a absorvância, refletância, luminescência, fluorescência, índice de refração efeitos fototérmicos e espalhamentos da radiação, em variações colorimétricas. Neste tipo de biossensores a luz é conduzida por meio de fibras ópticas até ao detector para guiar as ondas de luz como um eletrodo ou semicondutor [48].

2.6. GENOSENSORES

2.6.1. Uso e aplicações:

O comportamento eletroquímico do DNA e os efeitos de sua adsorção sobre diversos tipos de eletrodos (carbono, vidro, ouro etc), vêm sendo pesquisados há vários anos, biossensores baseados na hibridização de ácido nucléico tem recebido uma considerável atenção devido a sua potencial aplicação para o diagnóstico de várias doenças [49], [50]. A resposta eletroquímica sensível é baseada na oxidação direta de ácidos nucléicos, ou indiretamente pela reação redox de moléculas indicadoras de hibridização, como indicadores químicos [50]. A utilização de biossensores de ácidos nucleico pode ser vista em pesquisas envolvidas na detecção de doenças como: Tuberculose [51]; Papilomavirus Bovino [52]; Dengue [53].

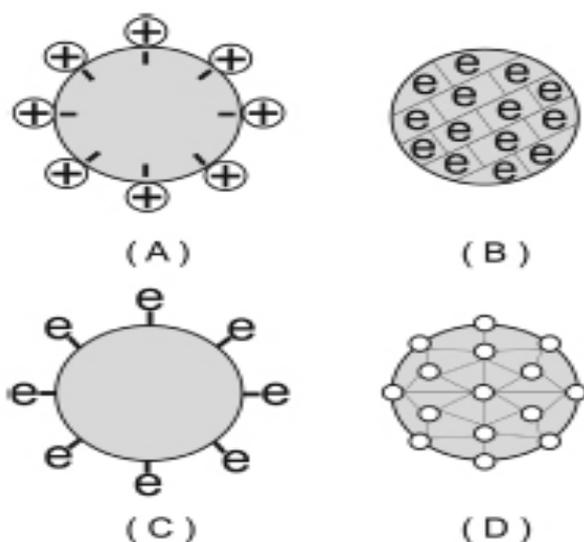
A versatilidade das técnicas eletroquímicas propiciou não apenas a análise estrutural dos ácidos nucléicos, como também sua determinação em baixos níveis de concentração. Com efeito, bases purínicas e pirimidínicas, além de oligonucleotídeos. A voltametria é praticamente insubstituível na análise qualitativa e quantitativa de muitos compostos orgânicos e na pesquisa

de composição e estrutura de íons e moléculas eletroquimicamente ativos em níveis de concentração muito baixos [54].

Inicialmente, o biossensor de ácidos nucleicos é feito a partir da imobilização de uma sequência de DNA (sonda) na superfície transdutora, visando o reconhecimento de sua sequência complementar (alvo) [52]. Existem vários métodos de imobilização sobre a superfície transdutora, tais com adsorção, encapsulação, ligação covalente e ligação covalente cruzada [52]. Para imobilização sobre da sonda pode-se utilizar adsorção física ou ligação covalente. No trabalho desenvolvido utilizamos a adsorção física da enzima que é o modo mais simples e rápido de imobilização. Baseia-se em interações físicas entre a enzima e a superfície da matriz. Já a ligação covalente ocorre entre os grupos funcionais da enzima e da superfície. A ligação covalente cruzada ocorre através da formação de um sistema reticulado das moléculas da enzima, formando uma rede rígida, e a encapsulação ocorre através do confinamento da enzima em uma membrana localizada na superfície do eletrodo. (Figura 7) [55].

Figura 7. Esquema ilustrativo dos quatro tipos básicos de métodos de imobilização: a) adsorção, b) encapsulação, c) ligação covalente e (d) ligação covalente cruzada.

Fonte: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010040422008000700034.



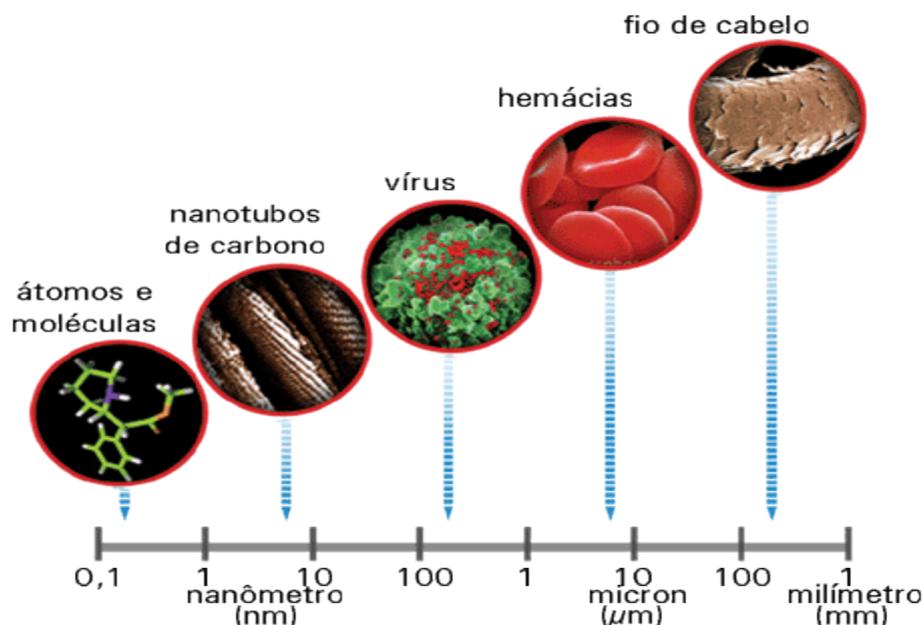
2.7. MODIFICAÇÕES DE SUPERFÍCIES SENSORAS

2.7.1. Nanopartículas

A nanotecnologia inclui a ciência de materiais para o domínio de partículas e interfaces com dimensões extremamente pequenas. As nanopartículas foram detectadas na década de 1980, com um microscópio eletrônico. Uma nanopartícula é um corpo tendo uma dimensão da ordem de 100 (equivalente a cerca de mil átomos). Em 2000, iniciou a comercialização de nanomateriais e, cada vez mais vem aumentando o desenvolvimento e procura por estes produtos. Partículas deste tamanho, ou "nanopartículas", apresentam uma grande área superficial e, frequentemente, exibem propriedades mecânicas, ópticas, magnéticas ou químicas distintas de partículas e superfícies macroscópicas. O aproveitamento dessas propriedades em aplicações tecnológicas forma a base da nanotecnologia de materiais (Figura 8) [56].

Figura 8. Dimensões representativas de algumas espécies típicas, em suas várias escalas.

Fonte: http://www.s3-sa-east-1.amazonaws.com/ofitexto.arquivos/deg_230778.htm.



Há pelo menos 30 anos, vários laboratórios no mundo desenvolvem pesquisas na direção da miniaturização, sobretudo de sistemas eletrônicos, nanopartículas, sistemas nanoparticulados. Uma das características marcantes da nanotecnologia é sua multidisciplinaridade. Trata-se de um encontro da química, física, engenharia e biologia. As diferentes interfaces são ricas de relevantes problemas científicos e oportunidades de geração de novas tecnologias [57].

A modificação da superfície do eletrodo, com compósitos híbridos tem levado ao desenvolvimento de vários sensores eletroquímicos. Em particular, as nanopartículas de ouro têm sido intensamente investigadas para o desenvolvimento de eletrodos biossensíveis [58].

2.7.2. Polianilina e Nanopartículas de Ouro

A junção das nanopartículas, são capazes de formar arranjos tridimensionais, que por sua vez possuem propriedades diferentes das nanopartículas isoladas e de eletrodos convencionais. Tais propriedades podem ser amplamente exploradas na busca na busca de sensores eletroquímicos com maior sensibilidade e seletividade para determinadas espécies de interesse [59].

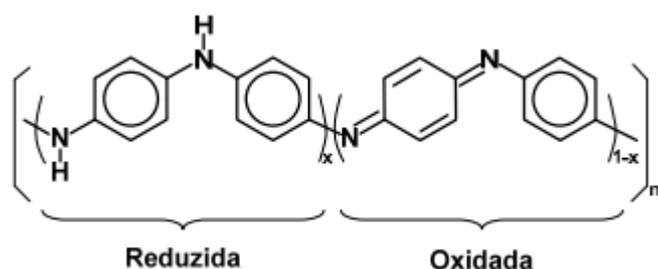
As nanopartículas de ouro (AuNps) apresentam propriedades eletrônicas, ópticas e químicas que chamam atenção para aplicações tecnológicas nas áreas de desenvolvimento da nanoeletrônica, sensores, óptica e catálise. Apresentam características como facilidade de síntese, funcionalização da superfície com moléculas de tiol, facilidade de transferência de elétrons, biocompatibilidade, baixa citotoxicidade, como também podem ser sintetizadas por métodos físicos ou químicos incluindo a redução de ácido tetracloraurico (HAuCl_4^+) [60]. Nos últimos anos estudos tem se destacado com relação ao uso de nanopartículas de ouro e biomoléculas [61], [62].

As nanopartículas sem revestimento são muito instáveis, apresentam alta energia superficial e tendem a agregar-se em solução. Assim, polímeros, dendrímeros, líquidos iônicos e surfactantes são usados para estabilizar, evitando que as nanopartículas formem aglomerados [63].

Atualmente os materiais poliméricos são utilizados em grande escala, em diversos setores da economia mundial. Entre os polímeros condutores, a polianilina (PANI) tem atraído grande atenção devido à sua ampla faixa de condutividade elétrica, propriedades eletroquímicas e ópticas, associadas à estabilidade química em condições ambientais e facilidade de síntese. Nos últimos anos, a polianilina (PANI) e polímeros derivados da anilina têm recebido grande atenção pela estabilidade química em condições ambientais, processabilidade, facilidade de polimerização e de dopagem a baixo custo. Após a polimerização química, a polianilina pode ser produzida em escala industrial, obtendo-se em alguns casos, polímeros de alta massa molecular, o que favorece a condutividade e a resistência mecânica [62].

A polianilina é um polímero linear conformado de anilina, o qual pode existir em um número de estados de oxidação, os seus anéis podem existir nas formas benzenóides assim como quinoides. A forma base da PANI é mostrada na (Figura 10) e consiste de cadeias unitárias repetidas reduzidas e oxidadas alternantes [64].

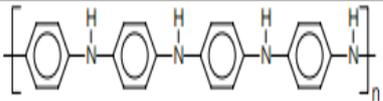
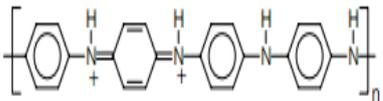
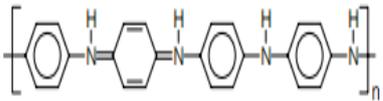
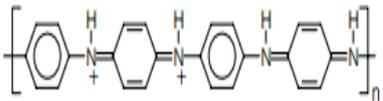
Figura 9. Estrutura geral da Polianilina (PAN), mostrando as unidades reduzidas (ganha elétrons) e oxidadas (perde elétrons). Fonte: http://www.maxwell.vrac.puc-rio.br/18472/18472_4.PDF



A polianilina e seus derivados formam uma outra classe de polímeros condutores em relação ao processo de dopagem. Ela pode ser dopada por protonação, isto é, sem que ocorra alteração do número de elétrons (oxidação/redução) associados à cadeia polimérica. A polianilina pode ocorrer em diferentes estados de oxidação, dos quais a forma esmeraldina, 50% oxidada, é a mais estável. A forma base esmeraldina (isolante) do polímero

pode reagir com ácidos (HCl) resultando na forma sal esmeraldina (condutora). A reação de protonação ocorre principalmente nos nitrogênios imínicos da polianilina (-N=). Este estado contém duas unidades repetitivas, a amina-fenileno e a iminaquinona. Além da elevada condutividade elétrica, que chega à ordem de 10^2 S cm^{-1} , outra propriedade interessante da polianilina é exibir diferentes colorações quando se variam as condições de pH ou o potencial elétrico. (Figura 11) [65].

Figura 10. Os três estados de oxidação mais importantes da polianilina: leucoesmeraldina, esmeraldina (isolante e condutora) e pernigranilina. Fonte: <http://www.qnesc.sbq.org.br/online/qnesc11/v11a03.pdf>.

Estado de oxidação	Estrutura	Cor*	Característica
Leucoesmeraldina		amarela 310	isolante completamente reduzida
Sal de esmeraldina		verde 320, 420, 800	condutora parcialmente oxidada
Base esmeraldina		azul 320, 620	isolante parcialmente oxidada
Pernigranilina		púrpura 320, 530	isolante completamente oxidada

O desenvolvimento de nanopartículas que atuam no diagnóstico (quantum dots, magnéticas, metálicas, polímeros, etc), como propriedades terapêuticas (nanopartículas magnéticas e metálicas), assim como a capacidade de uso específico por modificação da superfície com biomoléculas é um tema contínuo de pesquisas [66]. Como é o caso do nanocompósito híbrido de Polianilina e nanopartículas de ouro (PANIAuNps), através da junção das propriedades individuais dos dois materiais há a formação de um compósito estável, fácil síntese e com boa capacidade de formação de filme na superfície do eletrodo [53].

Estudo recentes demonstraram as vantagens do uso de nanopartículas metálicas. Nascimento et al. (2011) desenvolveram um biossensor baseado em

compósito híbrido de nanopartículas de ouro-polianilina (AuNpPANI) com grupos terminais sulfidríla (-SH) que, imobilizando primers específicos para os sorotipos de dengue 1, 2 e 3 (ST1, ST2 e ST3). Vicentini (2013) desenvolveu um biossensor à base de filmes poliméricos, nanotubos de carbono e nanopartículas de ouro.

2.8. MÉTODOS ELETROQUÍMICOS

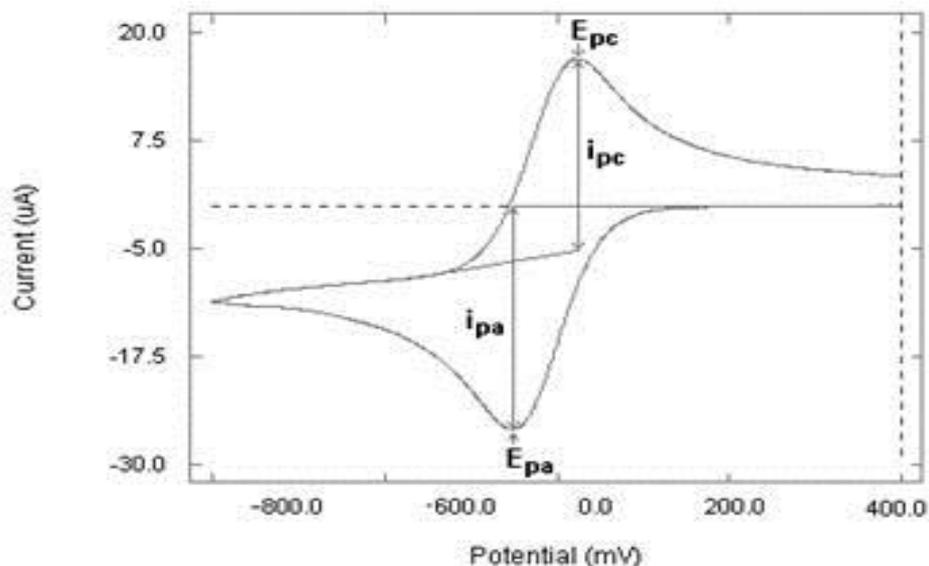
Os métodos eletroquímicos fazem uso de propriedades elétricas mensuráveis (corrente elétrica, diferenças de potencial, acúmulo interfaciais de carga, entre outros) a partir de fenômenos nos quais uma espécie redox interage física e/ou quimicamente com demais componentes do meio, ou mesmo com interfaces.

2.8.1. Voltametria cíclica

A voltametria cíclica é a técnica comumente usada para adquirir informações qualitativas sobre os processos eletroquímicos. A eficiência desta técnica resulta de sua característica de rapidamente fornecer informações sobre a termodinâmica de processos redox, da cinética de reações heterogêneas de transferência de elétrons e sobre reações químicas acopladas a processos adsorptivos [68].

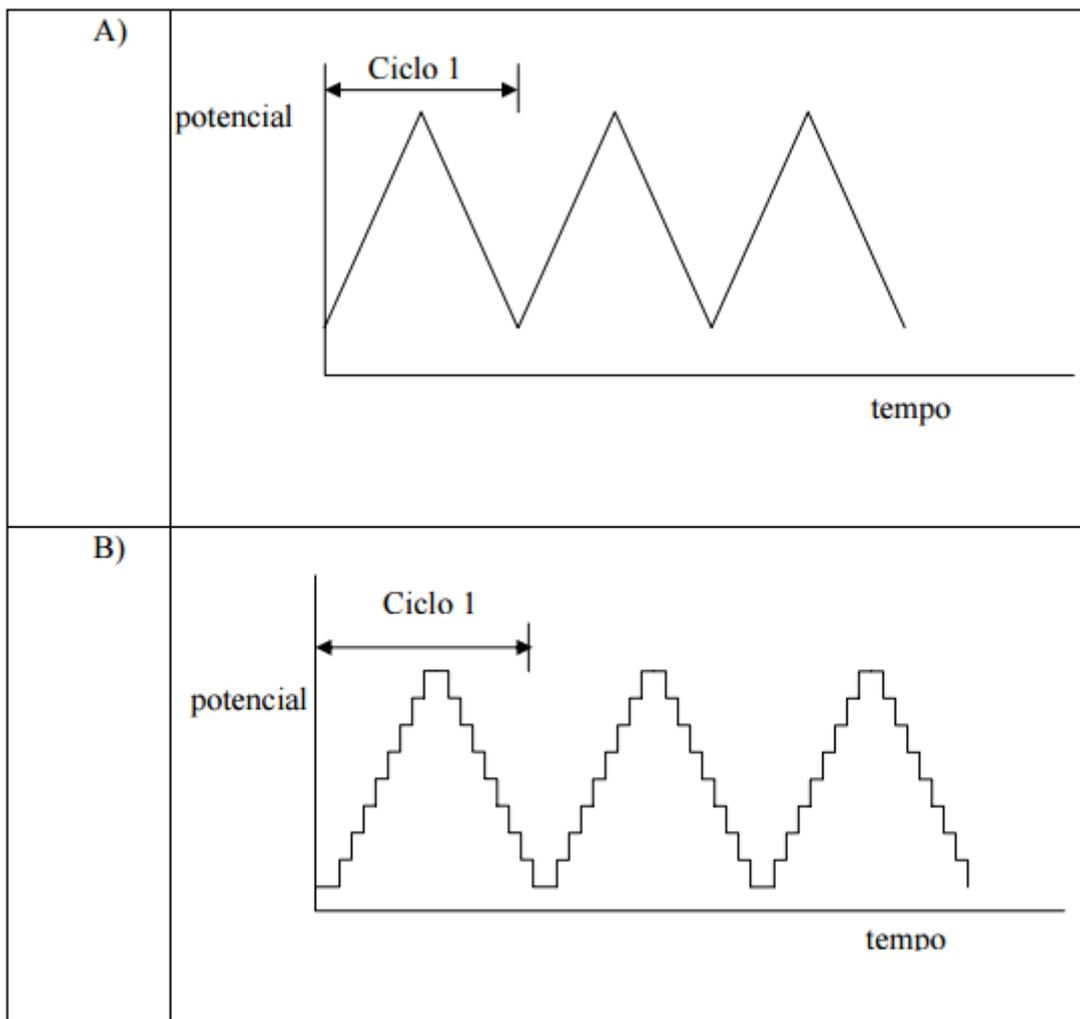
A voltametria cíclica consiste no varrimento de potencial de um eletrodo de trabalho o qual se encontra mergulhado numa solução em repouso, medindo-se a corrente resultante. Dado ser impossível medir potenciais absolutos, o potencial deste eletrodo é medido relativamente a um eletrodo de referência eletrodo podendo ser de vários tipos: Ag/AgCl, mercúrio calomelano etc. Neste trabalho utilizou-se o de Ag/AgCl. O potencial aplicado entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência pode ser considerado um sinal de excitação e a corrente resultante pode ser tida como um sinal de resposta [69].

http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S071833052014000300005&script=sci_arttext.



Inicia-se a aplicação do potencial de um valor no qual nenhuma redução ocorre, com o aumento do potencial para regiões mais negativas (catódica) ocorre a redução do composto em solução, gerando um pico de corrente proporcional à concentração deste composto, quando o potencial já tiver atingido um valor no qual nenhuma reação de redução ocorre, o potencial é varrido no sentido inverso, até o valor inicial, e no caso de uma reação reversível, os produtos que tiverem sido gerados no sentido direto (e se localizam ainda próximos à superfície do eletrodo) serão oxidados, gerando um pico simétrico ao pico da redução. O tipo de voltamograma gerado depende do tipo de mecanismo redox que o composto em questão sofre no eletrodo, o que faz da voltametria cíclica uma ferramenta valiosa para estudos mecanísticos (Figura 12) [70]. A forma de aplicação do potencial na voltametria cíclica é representada na (Figura 13), o potencial é varrido linearmente com o tempo no eletrodo de trabalho estacionário.

Figura 12 Formas de aplicação do potencial para a voltametria cíclica: a) potencial com varredura linear e b) potencial do tipo escada. Fonte: <https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/89173/235698.pdf?sequence=1>.



2.8.2. Espectroscopia de Impedância

A técnica de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE) é uma técnica de caracterização elétrica, que fornece um aspecto completo e detalhado das características elétricas da interface eletrodo/solução. Envolve a aplicação de uma perturbação de potencial ou de corrente no sistema sob investigação. A perturbação do sistema é feita mediante a aplicação de um potencial contínuo (potencial central aplicado) sobre a qual é superimposta uma variação senoidal de potencial com pequena amplitude. Este método de

aplicação do potencial possibilita que o sistema seja perturbado empregando poucos milivolts, de forma a tornar possível a investigação de fenômenos eletroquímicos próximos ao estado de equilíbrio.

Além disto, é possível perturbar o sistema usando diferentes valores de frequência, pois a onda de potencial é senoidal. Uma vez que a perturbação no sistema sob investigação é de pequena amplitude é possível empregar a técnica para a análise de etapas de um mecanismo reacional [71]. Numa mesma medida, podem ser determinadas a resistência de polarização e a capacitância da dupla camada [72].

A técnica de EIE oferece muitas vantagens como baixo custo, rapidez e facilidade de instrumentação. O uso de EIE em genossensores é devido as melhorias da transferência de elétrons que ocorre durante o processo de hibridização do DNA.

Atualmente, a EIE é utilizada em ampla gama de estudos, abrangendo desde o transporte eletrônico em dispositivos semicondutores até o estudo de processos cinéticos eletroquímicos das mais diferentes naturezas, ou seja, processos que ocorrem em baterias de íons lítio, células fotovoltaicas, sistemas de corrosão e/ou processos eletrocatalíticos. [71], [73], [74].

A EIE baseia-se na Lei Ôhmica: o potencial (U) sobre um condutor metálico, é proporcional, em temperatura constante, ao fluxo elétrico de corrente através do condutor (I).

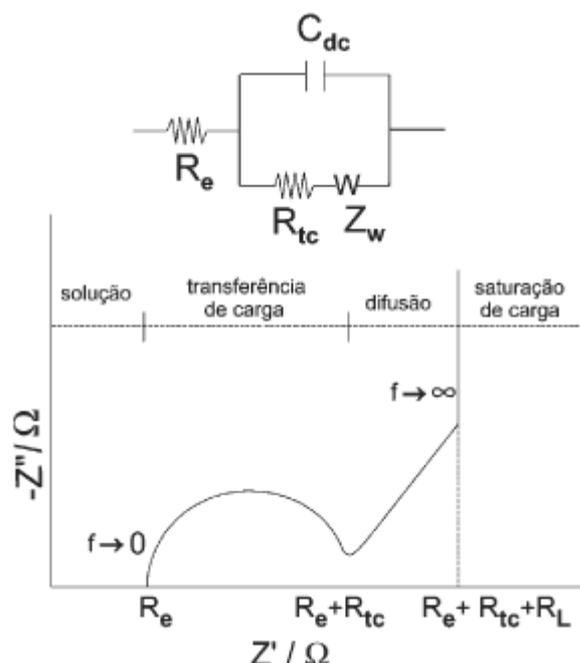
$$R = U/I$$

A lei ôhmica vale para todas as correntes e todos os potenciais elétricos, a resistência é independente da frequência da corrente; a corrente alternada e o potencial estão sempre em fase [74].

O circuito da (Figura 14) é conhecido como circuito de Randles. O circuito de Randles engloba a impedância de Warburg (Z_w). Este modelo prevê que a corrente faradaica resultante das transferências eletrônicas na interface está sempre associada ao componente capacitivo. Os componentes do circuito e as diferentes regiões de resposta em frequência representam o processo eletroquímico global. A região de alta frequência está associada com a

resistência da solução eletrolítica, R_e . A região de freqüências intermediárias está associada com a transferência de carga na interface, R_{tc} . O efeito de relaxação correspondente é apresentado no plano complexo (Z'' - Z') com um semi-círculo, cuja constante de tempo é dada pelo produto $R_{tc}C_{dc}$. [73].

Figura 13. Circuito do tipo Randles (no topo) e sua resposta idealizada no plano de impedância complexa. Fonte: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S010040422006000400029&script=sci_arttext.



Em baixas freqüências a impedância é caracterizada por processos de transporte de massa por difusão. Duas regiões podem ser identificadas no plano de impedância complexa: uma região linear com ângulo de fase $\pi/4$, correspondendo à difusão semi-infinita e representada pela impedância de Warburg, Z_w , e uma segunda região linear ainda em baixas freqüências com um ângulo de fase de $\pi/2$, associada com uma resposta puramente capacitiva. Considerando uma reação de eletrodo onde a etapa mais lenta está relacionada ao transporte iônico em direção a interface, é razoável considerar que a cinética da reação é limitada por difusão [73].

2.9. ANÁLISE MORFOLÓGICA

2.9.1. Microscopia Eletrônica de Varredura

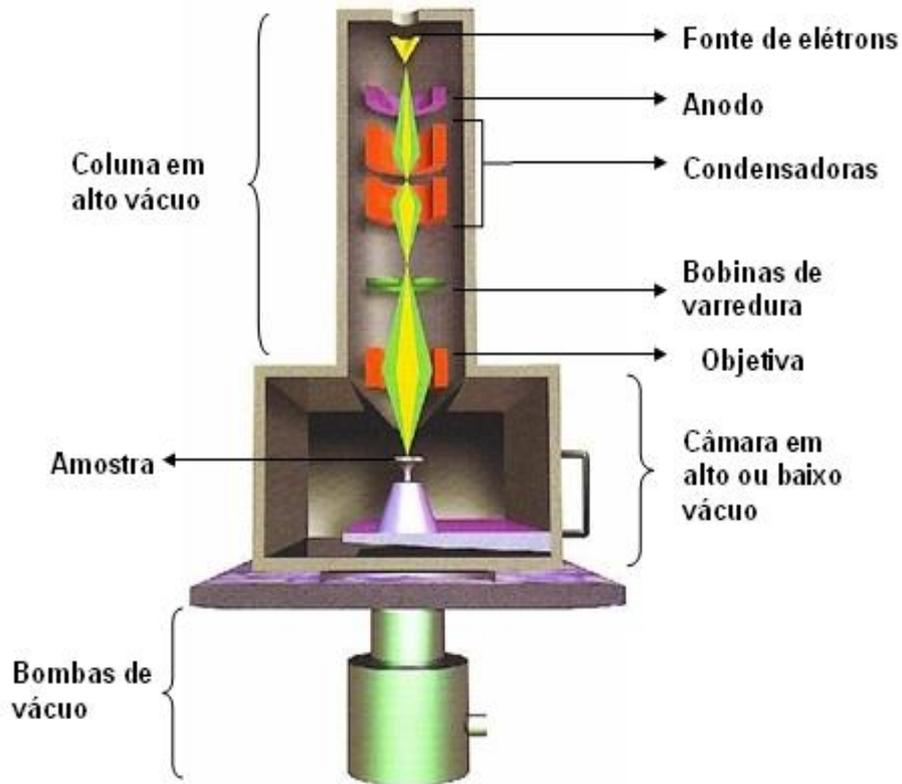
O primeiro microscópio eletrônico de varredura (MEV) surgiu em 1932, desenvolvido por Max Knoll e Ernest Renka Rusca, na Alemanha. O primeiro protótipo com capacidade de analisar amostras espessas, no entanto, foi construído por Zworykin, em 1942 [75].

O MEV é um instrumento muito versátil e usado rotineiramente para a análise microestrutural de materiais sólidos. Apesar da complexidade dos mecanismos para a obtenção da imagem, o resultado é uma imagem de muito fácil interpretação [76].

O princípio de funcionamento do MEV consiste na emissão de feixes de elétrons por um filamento capilar de tungstênio (eletrodo negativo), mediante a aplicação de uma diferença de potencial que pode variar de 0,5 a 30 KV. Essa variação de voltagem permite a variação da aceleração dos elétrons, e também provoca o aquecimento do filamento. A parte positiva em relação ao filamento do microscópio (eletrodo positivo) atrai fortemente os elétrons gerados, resultando numa aceleração em direção ao eletrodo positivo. A correção do percurso dos feixes é realizada pelas lentes condensadoras que alinham os feixes em direção à abertura da objetiva. A objetiva ajusta o foco dos feixes de elétrons antes dos elétrons atingirem a amostra analisada [75].

A medida que o feixe de elétrons primários vai varrendo a amostra estes sinais vão sofrendo modificações de acordo com as variações da superfície. Os elétrons secundários fornecem imagem de topografia da superfície da amostra e são os responsáveis pela obtenção das imagens de alta resolução, já os retroespalhados fornecem imagem característica de variação de composição [76] (Figura 15).

Figura 14. Desenho esquemático dos componentes básicos do MEV. Fonte: <http://www.pucrs.br/edipucrs/online/microscopia.pdf>.



3. JUSTIFICATIVA

A Leishmaniose é um problema de saúde pública, acomete principalmente Norte e Nordeste do país. Além disso, a leishmaniose destaca-se como a segunda causa de mortalidade dentre doenças negligenciadas. Atualmente o número de cães infectados constitui um problema na transmissão da infecção para humanos. Tendo em vista que ações como o desenvolvimento de novos sistemas de biodeteção visam a atender o Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral no Brasil. Este conjunto de ações visam a redução do número de óbitos por meio do diagnóstico e do tratamento precoces pelo desenvolvimento de biossensores para a Leishmania.

Desta forma, é de fundamental importância o desenvolvimento de biossensores eletroquímicos para detecção e diagnóstico de *Leishmania infantum* devido à possibilidade de uma análise rápida, sensível e de baixo custo.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Preparar e caracterizar filmes de PANIAuNps depositados sobre eletrodo de ouro e avaliar a interação com o sistema LiG-LiP-PANIAuNps-*Leishmania*, para aplicação como sensor impedimétrico e voltamétrico para detecção de Leishmaniose.

4.2 Objetivos Específicos

- Determinação de parâmetros físico – químicos da sonda de *Leishmania*, como elemento de biodetecção;
- Avaliação das características eletroquímicas da interação da sonda de *Leishmania* com o sistema LiG-LiP-PANIAuNps;
- Estudo das propriedades interfaciais do sistema LiG-LiP-PANIAuNps-*leishmania*, bem como avaliação da bioatividade deste sistema frente as amostras de *L. chagasi*;
- Análise morfológica e estrutural dos filmes biológicos de LiP-PANIAuNps-*leishmania* e LiG-LiP-PANIAuNps-*leishmania* genoma por microscopia eletrônica de varredura.
- Determinação da capacitância da dupla camada elétrica (Cdl) através de cálculos teóricos a partir de resultados experimentais e da resistência a transferência de cargas (Zre).
- Determinação das correntes de pico anódicas (ipa) e catódicas (ipc) dos voltamogramas cíclicos;

5. METODOLOGIA

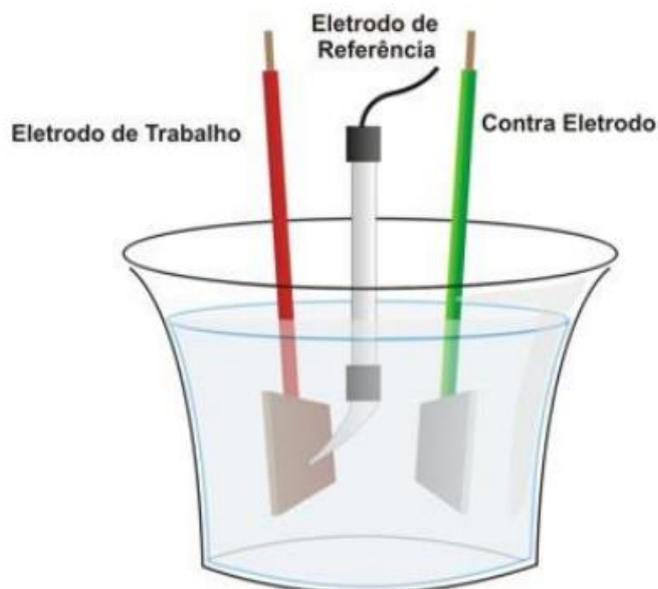
5.1 Materiais

Amostras sanguíneas de cães foram coletadas e armazenadas com anticoagulante citrato. Os reagentes eram de grau analítico e usados tal como recebidos. A polianilina, ouro (III) tri-hidrato de cloreto de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (ácido tetracloroaúrico), MPTS (3-mercaptopropil trimetoxisilano), foram obtidos a partir de Sigma- Aldrich (St. Louis, EUA). Ferri- ferrocianeto de potássio e foram obtidos a partir VETEC (Brasil). Água ultrapura foi obtido a partir de um Milli-Q Plus (Billerica, EUA) Sistema de purificação.

5.2 Equipamentos

As medidas eletroquímicas foram realizadas num Potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT128N numa célula convencional de três eletrodos, eletrodo de trabalho modificado com nanopartículas de ouro e polianilina, eletrodo de ouro como contra eletrodo e eletrodo de referência Ag/AgCl (KCl saturado) usados durante todo o trabalho (Figura 16). As imagens de microscopia eletrônica de varredura, foram obtidas a partir de um JSM 5900 (JEOL instruments, Japão) a uma voltagem de aceleração de 10 kV e uma distância de trabalho de 5 μm .

Figura 15. Célula convencional de três eletrodos. Fonte: <http://www.pt.wikipedia.org/wiki/Potenciostato>.



5.3 Síntese das nanopartículas (PANIAuNps)

Nanocompósitos foram obtidos de acordo com MELO e colaboradores (2009). Foi feita uma mistura de anilina (0,030 mol/L), MPTS ($6,46 \cdot 10^{-2}$ mmol/L), $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (0,81 mmol/L) em uma solução de etanol. Subsequentemente agitação magnética (1100rpm) por 48hrs. As amostras foram centrifugadas por 10 min (12.000 RPM) para remoção do excesso de MPTS, posteriormente foi adicionado 500 μl para 0,1 M HCl para obter PANi carregada positivamente e hidrólise MPTS.

5.4 Preparação do sistema LiG-LiP-PANIAuNps-*Leishmania*

Eletrodo de ouro foi polido com alumina 0,5 μm e submetido a ultra sonicação por 1 minuto em água deionizada, e posteriormente seco com nitrogênio (N). Em seguida, o eletrodo de ouro foi submetido a um potencial de -0,2 V para torná-lo catódico por 2 min. Posteriormente, o eletrodo foi imerso no sistema LiP-PANIAuNps-*Leishmania* por 10min, em seguida foi removido e seco. Após obtenção do eletrodo modificado com LiP-PANIAuNps-*Leishmania*, este

sistema foi submetido a incubação com o genoma de pacientes contaminados com genoma de *L. infantum* diluídos em tampão fosfato de sódio (TFS) pH 7,4 [78].

5.5 Análise do sistema LiG-LiP-PANIAuNps-*Leishmania* frente ao material coletado de cães contaminados

Após obtenção do eletrodo modificado com PANIAuNps-primer_{Leishmania} e avaliação de sua viabilidade de ação, o sistema foi utilizado para detecção genoma de cães contaminados com *L. infantum* diluídos em tampão fosfato de sódio pH 7,4. [51], [53], [78]. Os experimentos de hibridização foram realizados por gotejamento no eletrodo modificado com NpAuPANi-primer_{Leishmania} em diferentes concentrações da sequência alvo do DNA genômico (0,01 pg mL⁻¹, 0,1 pg mL⁻¹, 0,01 ng mL⁻¹, 01, ng mL⁻¹, 1 ng mL⁻¹ e 10 ng mL⁻¹). Finalmente, os eletrodos hibridizados foram lavados com água deionizada.

5.6 Medidas eletroquímicas

Os experimentos de voltametria cíclica foram realizados após cada etapa da montagem do eletrodo na presença de uma solução de 10mM de ferro-ferricianeto de potássio, [K₃ (Fe (CN)₆)/ K₄(Fe(CN)₆)] (1:1) como indicador redox em NaCl, a varredura foi de -0,2 a 0,7V com varredura de 50mV/s. As medidas de impedância eletroquímica foram realizadas na mesma solução de ferro-ferricianeto de potássio numa faixa de frequência de 100 mHz a 100 KHz com um potencial de amplitude alternada de 10mV [78]. Todas as medidas eletroquímicas foram realizadas em temperatura ambiente e dentro de uma gaiola de Faraday.

5.7. Caracterização morfológica- Microscopia eletrônica de varredura

A análise morfológica foram realizadas utilizando um JSM 5900 (JEOL instrumentos, Japão) a uma voltagem de aceleração de 15 kV e com uma distância de trabalho de 15 μM. Uma fina camada de ouro foi aplicado por pulverização catódica sobre as amostras utilizando um evaporador de metal.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] VILELA, M.; MENDONÇA, S.; *Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz)*, 2013.
- [2] REIS, A.B., MARTINS-FILHO, O.A., TEIXEIRA- CARVALHO, CARVALHO, M. G., MAYRINK, W.,FRANÇA-SILVA, J.C., GIUNCHETTI, R.C., GENARO, O., CORREA-OLIVEIRA, R. **Res. Vet. Sci.** 81, 68,2006.
- [3] HERENIO, E.M., FORTES, R.C., RINCON, G. Prevalence of visceral Leishmaniasis in dogs of Federal District, according to center of zoonoses Brasília. **J Health Sci Inst.** 2014;32(2):126-9
- [4] OLIVEIRA, J. M., FERNANDES, A. C., DORVAL, M. E. C., ALVES, T. P.,FERNANDES,T. D., OSHIRO, E. T., de Oliveira, A. L. L.. Mortality due to visceral leishmaniasis: clinical and laboratory characteristics. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 43(2):188-193, mar-abr, 2010.
- [5] ALVES, W. A., BEVILACQUA, P. D. **Cadernos de Saúde Pública** 20, 259, 2004.
- [6] TEIXEIRA-NETO, R.G., GIUNCHETTI, R.C., CARNEIRO, C.M., VITOR, R.W., COURAVITAL, W.,QUARESMA, P.F., KER, H.G., DE MELO, L.A., GONTIJO, C.M., REIS, A.B. **Vet. Paras.**, 11, 248, 2012.
- [7] FERROGLIO, E.,CENTARO, E., MIGNONE, W., TRISCIUOGLIO, A. **Vet. Parasitol.** 144, 162, 2007.
- [8] GONTIJO, C.M.F., MELO, N.M. **Revista Brasileira de Epidemiologia** 7, 338, 2004.
- [9] ZHANG, J., SONG, S., ZHANG, L., WANG, L., WU, H., PAN, D., FAN, C. J AM. **CHEM Soc.** 128, 8575, 2006.
- [10] XUE, D.; ELIOTT, C. M.; GONG, P.; GRAINGER, D. W.; BIGNOZZI, C. A.; CARAMORI, S. Indirect electrochemical sensing of DNA hybridization based on the catalytic oxidation of cobalt (II). **Journal of the American Chemical Society.** 129 (2007) 1854-1859.
- [11] ZHAO, G.; XU, J.J.; CHEN, V. **Electrochemistry Communications**, 2006; 8, 148-154.

- [12] YU, Y. Y., CHANG, S.S., LEE, C.L., WANG, C.R.C. J. **Phys. Chem. B**, 101, 6661, 1997.
- [13] FERREIRA, C.A., RODRIGUES, M. A. S., AMADO, F. D. R., Desenvolvimento de Membranas e Filmes Auto-suportados a partir de Polianilina: **Síntese, Caracterização e Aplicação. Polímeros**, vol. 21, nº 4, p. 259-264, 2011.
- [14] ANDRADE, C.A.S., SANTOS, C.G., DE MELO, C.P. Compósitos de nanopartículas fluorescentes em sí, processo para preparação dos mesmos e uso em sistemas de diagnóstico rápido com afinidade a moléculas biológicas. Nº 00184.2008.
- [15] OLIVEIRA, M.D. L.; DE MELO, C.P.; GLAUCIUS, O.; ANDRADE, C.A.S. Development of impedimetric and optical calcium biosensor by using modified gold electrode with porcine S100a12 protein, **Colloids and surfaces B** 82 (2011) 365-370.
- [16] CAMPOS R.M. Caracterização molecular de antígenos de Leishmania (Leishmania) chagasi potencialmente úteis no controle da leishmaniose visceral. 2007. 114 f. **Dissertação (Mestrado em Saúde Pública)** - Fundação Oswaldo Cruz- Centro de Pesquisas AGGEU MAGALHÃES, Recife, 2007
- [17] MURRAY, H.W. et al. Advances in leishmaniasis. **Lancet**, London, v. 366, p. 1561-1577, 2005.
- [18] BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana**. Brasília, 2010
- [19] VILELA, M.; MENDONÇA, S.; Instituto Oswaldo Cruz (**IOC/Fiocruz**), 2013
- [20] MOHAN, S., SRIVASTAVA, P., MAHESHWARI, S. N., SUNDAR, S., PRAKASH, R. Nano-structured nickel oxide based DNA biosensor for detection of visceral leishmaniasis (Kala-azar). **Analyst**, 2011, 136, 2845.
- [21] OLIART-GUZMÁN, H., MARTINS, A. CMANTOVANI, S. A. S., BRAÑA, A. M., Delfino, B. M., PEREIRA, T. M., SANTOS, A. P., JÚNIOR, J. A. F., BRANCO, F. L. C. C., CAMPOS, R. G., OLIVEIRA, C. S. M., MUNIZ, P. T., e NUNES, M. S. Características epidemiológicas da leishmaniose tegumentar americana na fronteira amazônica: estudo retrospectivo em Assis Brasil, Acre. **Rev Patol Trop** Vol. 42 (2): 187-200. abr.-jun. 2013

- [22] OLIVEIRA, L. S.; NETO, R. V. D.; BRAGA, P. E. T. Perfil epidemiológico dos casos de Leishmaniose Visceral em Sobral, Ceará no período de 2001 a 2010. **S A N A R E**, Sobral, V.12, n.1, p. 13-19, jan./jun. - 2013
- [23] GONTIJO, C.M.F.; MELO, M.N., Visceral Leishmaniasis in Brazil: current status, challenges and prospects. **Rev. bras. epidemiol.** vol.7 no.3 São Paulo Sept. 2004
- [24] BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. 1ª edição, 5ª reimpressão, Brasília-DF, 2014.
- [25] QUEIROZ, M.J.A., ALVES, J.G.B., CORREIA, J.B. Leishmaniose visceral: características clínico-epidemiológicas em crianças de área endêmica. **J Pediatría** (Rio J). 2004.
- [26] IKEDA-GARCIA, F. A., MARCONDES, M. Métodos de diagnóstico da leishmaniose visceral canina. **Clínica Veterinária**, ano XII, n. 71, p. 34-42, 2007.
- [27] IFI- Leishmaniose Humana bio-manguinhos imunofluorescência indireta para diagnóstico da Leishmaniose Humana. **Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos. Ministério da Saúde**. Fio Cruz. Fundação Oswaldo Cruz, 2009. Rio de Janeiro.
- [28] QUEIROZ, N. M. G. P., ASSIS, J., OLIVEIRA, T. M. F. S., MACHADO, R.Z., NUNES, C. M., BUZZETTI, W. A. S. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina pelas técnicas de imunistoquímica e PCR em tecidos cutâneos em associação com a RIFI e ELISA-teste. **Rev. Bras. Parasitol. Vet., Jaboticabal**, v. 19, n. 1, p. 32-38, jan.-mar. 2010.
- [29] SCHUBACH, T. M. P. et al. Avaliação da intradermorreação e sorologia para a leishmaniose em cães com esporotricose. **Ciência Animal**, Ceará, v. 11, n. 3, supl1, p. 193, 2001.
- [30] NOUGUEIRA, J.L. et al. A importância da leishmaniose visceral canina para a saúde Pública: uma zoonose reemergente. **Revista científica eletrônica de medicina veterinária**. Ano VII – n.13, Garça/SP, 2009.
- [31] LOUREIRO, C.C.P. DADALTI, P., GUTIERREZ, M.C.G., SILVA. M.R. **Leishmaniose: métodos diagnósticos - Folha médica** 1998;117(2):131-134.

- [32] SAMPAIO, R. N. R., ANDRADE, G.B., PEREIRA, A.C., SILVA, E. A., CUBA, C. A. Estudo comparativo de técnicas de demonstração de amastigotas e isolamento de promastigotas no diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana. **An. Bras. Dermatol.** vol.77 n. 5 Rio de Janeiro Sept./Oct. 2002.
- [33] PELISSARI, D.M., CECHINEL, M.P., GOMES, M.L.S., JÚNIOR, F.E.F.L. Tratamento da Leishmaniose Visceral e Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil. **Epidemiol. Serv. Saúde**, Brasília, 20(1):107-110, jan-mar 2011.
- [34] WANG, S.F., TAN, Y.M., **Anal. Biochem.** 387, 703, 2007.
- [35] SOUZA, E.V.M. et al. Label-Free Electrochemical Detection of the Specific Oligonucleotide Sequence of Dengue Virus Type 1 on Pencil Graphite **Electrodes. Sensors** 2011, 11, 5616-5629.
- [36] SALGADO, A. M. (2001), Desenvolvimento e aplicação de sensores e sistemas de monitoração de biomassa, etanol e de substrato por modelo. **Tese de Doutorado**, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.
- [37] M.D'IAZ-GONZ'QLEZ., M. B. GONZ' ALEZ- GARCÍA., AND A. COSTA- GARCÍA. "Immunosensor for Mycobacterium tuberculosis on screen printed carbono electrodes". **Biosensors and Bioelectronics**, vol. 20, no. 10, pp. 2035-2043, 2005.
- [38] LIU, S., LEECH, D., JU, H. **Anal. Lett.** 2003. 36,1.
- [39] MOZAZ, R.S., MARCO, M.P., ALDA, M.J.L., et al., 2004, "Biosensors for Environmental Monitoring of Endocrine Disruptors: a Review Article". **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 378, n. 3, pp. 588-598.
- [40] CHAMBERS, J. et al. Biosensor recognition elements. **Curr. Iss. Mol. Biol.** 2008, 10, 1-12.
- [41] RICCARDI, C.S., COSTA, P.I., YAMANAKA, H. Imunossensor amperométrico. **Quím. Nova** vol.25 n.2 São Paulo Abr./May 2002.
- [42] THEVENOT, D. R. et al. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 16, n. 1-2, p. 121-131, Jan 2001.

- [43] LABUDA, J. et al. Electrochemical nucleic acid-based biosensors: Concepts, terms, and methodology (IUPAC Technical Report). **Pure Appl. Chem.** 2010, 82(5), 1161-1187.
- [44] XING, L., KE M., SHOUJUN, Z., SHIYU, Y., ZHAOYANG, L., BIN, X., BAI, Y., and WENJING, T. Fluorescent Aptasensor Based on Aggregation-Induced Emission Probe and Graphene Oxide. **Anal. Chem.**, 2014, 86 (1), pp 298–303.
- [45] GAUA, V. et al. Electrochemical Molecular Analysis without Nucleic Acid Amplification. **Methods**, v.37, n.1, p.73-83, set 2005.
- [46] WANG, Y. et al. Electrochemical Sensors for Clinic Analysis. **Sensors**, v.8, p.2043-2081, mar 2008.
- [47] GERARD, M., CHAUBEY, A., MALHORTA, B. D., **Biosens. Bioelectron.** 2002, 17, 345.
- [48] MEHRVAR, M.; ABDI, M. Recent Developments, Characteristics, and Potential Applications of Electrochemical Biosensors. **Analytical Sciences**, v.20, p.1113-1126, ago 2004.
- [49] ZHANG, J., SONG, S., ZHANG, L., WANG, L., WU, H., PAN, D., FAN, C. **J Am Chem Soc.** 128, 8575, 2006.
- [50] SOUZA, E.V.M. et al. Label-Free Electrochemical Detection of the Specific Oligonucleotide Sequence of Dengue Virus Type 1 on Pencil Graphite Electrodes. **Sensors** 2011, 11, 5616-5629.
- [51] COSTA, M.P., ANDRADE, C.A.S., MONTENEGRO, R.A., MELO, F.L., OLIVEIRA, M.D.L. Self-assembled monolayers of mercaptobenzoic acid and magnetite nanoparticles as an efficient support for development of tuberculosis genosensor. **Journal of Colloid and Interface Science** 433 (2014) 141–148.
- [52] NASCIMENTO, G.A. et al. Electrochemical DNA Biosensor for Bovine Papillomavirus detection using polymeric Polymeric Film on Screen-printed **Electrode. Biosens. Bioelectron.** 2012, 38, 61-66.

- [53] NASCIMENTO, H.P.O., OLIVEIRA, M.D.L., MELO, C.P., SILVA, G.J.L., CORDEIRO, M.T., ANDRADE, C.A.S. An impedimetric biosensor for detection of dengue serotype at picomolar concentration based on gold nanoparticles-polyaniline hybrid composites. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces** 86 (2011) 414–419.
- [54] KARAMOLLAOĞLU, H.A.; OKTEM, M.M. QCM-based DNA biosensor for detection of genetically modified organisms (GMOs). **Biochem. Eng. J.** 2009, 44, 142-150.
- [55] MARQUES, P. R. B.O., YAMANAKA, H. Biossensores baseados no processo de inibição enzimática. **Quím. Nova** vol.31 no.7 São Paulo 2008.
- [56] QUINA, F. Nanotecnologia e o meio ambiente: perspectivas e riscos. **Quím. Nova**, Vol. 27, No. 6, 1028-1029, 2004.
- [57] **Cartilha sobre Nanotecnologia**. Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial (ABDI), Brasília-DF, 2010.
- [58] YU, Y.Y., CHANG, S.S., LEE, C.L., WANG, C.R.C. J. Phys. **Chem. B**, 101, 6661, 1997.
- [59] SARGENTELLI, V., FERREIRA, A.P. Nanopartículas magnéticas: o cobalto. **Eclet. Quím.** vol.35 no.4 São Paulo 2010.
- [60] MEDLEY, C.D. **Analytical Chemistry** 2008; 80: 1067- 1072.
- [61] OLIVEIRA, M. D. L. ; ANDRADE, C. A.S. ; CORREIA, M. T.S. ; COELHO, L. C. B. B₂ ; PANKAJ, R.S. ; ZENG, X. Impedimetric biosensor based on self-assembled hybrid cystein-gold nanoparticles and CramoLL lectin for bacterial lipopolysaccharide recognition. **Journal of Colloid and Interface Science** (Print), v. 362, p. 194-201, 2011.
- [62] VIDOTTI, M., CARVALHAL, R.F., MENDES, R. K., FERREIRA, D. C. M., KUBOTA, L. T. Biosensors Based on Gold Nanostructures. **J. Braz. Chem. Soc.**, Vol. 22, No. 1, 3-20, 2011.
- [63] HUANG, W., CHEN, S., LIU, Y., FU, H., WU, G. The controlled synthesis of stable gold nanoparticles in quaternary ammonium ionic liquids by simple heating. **Nanotechnology**, v. 22, n., p. 25602-25608, 2011.

- [64] AUGUSTO, T. Introdução a Polímeros Condutores: Síntese e Caracterização Eletroquímica da Polianilina. **Trabalho de conclusão. Universidade de São Paulo. Instituto de Química**, São Paulo, 2009.
- [65] SANTANA, A. T. Polímeros condutores: estudos e utilização de polímeros condutores. Centro Universitário Estadual da Zona Oeste. Rio de Janeiro, 2012.
- [66] AKIRA, I. et al. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 2005; 100: 1-11.
- [67] VICENTINI, F.C., Desenvolvimento de biossensores à base de filmes poliméricos, nanotubos de carbono e nanopartículas de ouro. Apresentação **Tese**. Universidade Federal de São Carlos. São Carlos-SP, 2013
- [68] PACHECO, W. F., SEMAAN, F. S., ALMEIDA, V. G. K., RITTA, A. G. S. L., Aucélio, R. Q. Revista Virtual de Química ISSN 1984-6835 Julho-Agosto 2013 517 **Rev. Virtual Quim.**, Vol 5, No. 4, p. 516-537. Voltametrias: Uma Breve Revisão Sobre os Conceitos
- [69] BRETT, C. M. A.; BRETT, A. M. O., **Electrochemistry: Principles, Methods, and Applications**, Oxford, 1993.
- [70] CARMO, D. R., SILVA, R. M., STRADIOTTO, N. R. Estudo eletroquímico de Fe[Fe(CN)₅NO] em eletrodo de pasta de grafite. **Eclet. Quím.** vol.27 no.special São Paulo 2002.
- [71] DAMOS, F.S., MENDES, R. K., KUBOTA, L.T.. Aplicações de QCM, EIS e SPR na investigação de superfícies e interfaces para o desenvolvimento de (bio)sensores. **Quím. Nova** vol.27 no.6 São Paulo Nov./Dec. 2004.
- [72] SANTOS, E. S. Preparação e Caracterização por Espectroscopia de Impedância Eletroquímica de Biossensores à base da proteína PNA sobre substratos cerâmicos. **Dissertação curso de pós-graduação em nanociências e materiais avançados**. Santo André, 2012.
- [73] CARVALHO, L. A., ANDRADE, A. R., BUENO, P.R. Espectroscopia de impedância eletroquímica aplicada ao estudo das reações heterogêneas em ânodos dimensionalmente estáveis. **Quim. Nova**, Vol. 29, No. 4, 796-804, 2006.

- [74] SANTOS, A. R., Análise por impedância eletroquímica “on-line” de conjuntos eletrodo/membrana (mea) de células a combustível a membrana polimérica (PEMPC). **Tese programa Tecnologia Nuclear**. São Paulo, 2007.
- [75] DEDAVID, B. A., GOMES, C. I., MACHADO, G. Microscopia Eletrônica de Varredura. PUCRS, Porto Alegre, 2007.
- [76] CASTRO, L. A. S. Processamento de Amostras para Microscopia Eletrônica de Varredura. **Embrapa**, Pelotas, RS, 2002
- [77] MELO, C. P., SANTOS, C. G., ANDRADE, C. A. S. US **Patent PCT/BR2009/000117, 2009.**
- [78] OLIVEIRA, M. D. L. **Tese de Doutorado**. Estudo bioeletroquímico de nanossistemas híbridos de nanopartículas de ouro e lectinas para o desenvolvimento de sensores. Recife, 2008. 61p. Programa de Pós graduação em Química. PPGQ- Universidade Federal de Pernambuco- 2008.

**BIOSENSOR FOR LEISHMANIA INFANTUM GENOME BASED ON
POLYANILINE-GOLD NANOPARTICLES HYBRID COMPOSITE**

Maria F. K. dos S. Garcia¹, Cesar A.S. Andrade², Celso P. de Melo³,
Daliane S. Gomes², Lidiane G. Silva⁴, Raimundo V. Dias⁵,
Valdir Q. Balbino⁴, Maria D.L. Oliveira^{1,2}

¹*Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de
Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil*

²*Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901
Recife, PE, Brazil*

³*Departamento de Física, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife,
PE, Brazil*

⁴*Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901
Recife, PE, Brazil*

⁵*Centro de Controle de Zoonoses, Rua Finlândia S/N, Parque Silvana II, Sobral,
62010-970, Ceará, Brazil*

*To whom correspondence should be addressed.

M.D.L. Oliveira, Departamento de Bioquímica, UFPE, 50670-901, Recife, PE, Brazil

Phone: +55-81-2126.8450; Fax: +55-81-2126.8547

E-mail: m_danielly@yahoo.com.br

Abstract

In this work, an electrochemical sensor for specific detection of *Leishmania infantum* genome (LiG) was developed. The sensorial system is based on the immobilization of a DNA probe onto a gold electrode surface previously covered with a layer of a SH-terminal group carrying polyaniline-gold nanoparticles hybrid composite (PANI/AuNp). Scanning electronic microscopy (SEM), cyclic voltammetry (CV), and electrochemical impedance (EI) techniques were applied to evaluate the immobilization of *L. infantum* primer (LiP) on AuNp/PANI. SEM images for AuNp/PANI-probe systems indicate that the film of the hybridized biomolecules was homogenous, compact and dense. Experimental results indicate that even when immobilized the probe retained its bioactivity. The primer-genome interaction was evaluated by cyclic voltammetry (CV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS) using a $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ redox pair. Both CV and EIS results have shown unequivocal evidence that the sensor presents specific detection of LiG based on primer-genome interactions. The LiG detection is translated as observable changes in the charge transfer resistance and the cathodic/anodic peak current. A stepwise modification on the bare gold electrode is accompanied not only by a decrease in its amperometric response, but also by an increase in the peak-to-peak separation between the cathodic and anodic waves of the redox probe. We also evaluated the sensor response to actual positive samples obtained from contaminated dogs. Our results indicate that it is feasible to use this biosensor to detect LiG even at low concentrations (0.01 pg mL^{-1}).

Keywords: Biosensor; Leishmania infantum; nanocomposite; impedance spectroscopy; cyclic voltammetry.

1. Introduction

Leishmaniasis, a widespread zoonotic disease with various clinical manifestations represents a serious anthroponosis [1]. When not properly treated, visceral leishmaniasis (VL), the most severe clinical manifestation of leishmaniasis, which is caused by the *Leishmania infantum* parasite can lead to high rates of mortality [2].

A prevalent disease in rural areas of Brazil, VL has recently been established in urban or peri-urban areas, where the environmental conditions are favorable for maintenance of its life cycle [3]. Domestic dogs are the main host of *L. infantum*, and the clinical presentation in this host may range from asymptomatic to systemic manifestations characterized by fever, anemia, hepatomegaly, splenomegaly, renal alterations, skin disease, ocular lesions, disorders of the cardiovascular and respiratory system [3, 4].

In general, VL is confirmed by microscopic identification of the presence of amastigotes, the reproductive form of the parasite, in bone marrow or spleen aspirates. Although this method can be considered as a gold standard for the VL diagnosis [5], since culture and isolation of the parasites seem unpractical in terms of the time involved and related costs [6].

Diverse tests such as polymerase chain reaction (PCR), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), direct agglutination test (DAT) [6] and the fast agglutination screening test (FAST) [7] have been already examined for diagnosis of VL, and specific limitations found for each one of these alternative procedures [7]. Therefore, it makes sense to look for new methods and techniques aiming a simple biosensing platform for genetic detection of *Leishmania infantum*.

Biosensors have been an strategic alternative with enormous applicability for the development of new methods for nucleotide sequences analysis [8]. Electrochemistry detection of specific DNA sequences is useful for diagnosis of several human diseases [9]. Considerable efforts have been directed to explore the potential of cyclic voltammetry (CV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS) as transducing mechanisms for the development of genosensors, mainly due to their capacity for converting biological events in an analytical signal with high selectivity and sensitivity. In addition, electrochemical analysis can provide auxiliary useful information about the electrode kinetics, electrical double layer formation and interface behavior of biologically modified electrodes [10].

Nowadays nanomaterials appear as an excellent alternative of active agents for the development of biosensors with increasing sensibility. In fact, there has been recently an increased attention for the synthesis of new nanocomposites based on polymer and metal nanoparticles, resulting in hybrid materials with synergistic properties [11, 12] that appear as versatile tools for electrochemical DNA biosensing. In that regard, polyaniline-gold nanoparticles (PANIAuNP) hybrid composites exhibit outstanding properties, such as increased surface area, controllable levels of electrical conductivity and interesting optical properties [13].

In this work, we developed an electrochemical biosensor platform based on PANIAuNP hybrid composite for use in *Leishmania infantum* genome (LiG) detection. The proposed sensing platform can be adapted for monitoring LiG presence via DNA hybridization even at low concentrations of the analyte.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

Blood samples (~5 mL) from dogs were collected by venipuncture (the corresponding protocol was approved by ethics committee - process n° 23076.051904/2013-48), with the Center for Zoonosis Control (CE, Brazil) team support, and was stored in anticoagulant acid citrate dextrose solution (citric acid 0.0038 M; tribasic sodium citrate 0.075 M, 0.133 M dextrose) at 4°C. Reagents were of analytical grade and used as received. Polyaniline, gold(III) chloride trihydrate (HAuCl₄.3H₂O), 3-mercaptopropyl)trimethoxysilane (MPTS) were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Potassium ferri- and ferrocyanide were obtained from VETEC (Brazil). Ultrapure water was obtained from a Milli-Q plus (Billerica, USA) purification system.

2.2 Molecular procedures and *Leishmania infantum* detection for real-time PCR

DNA extraction from whole blood was performed using the Mini Salting Out method, which consists of the following steps: leukocytes dissolution, protein digestion and elimination, and DNA precipitation and washing, as described by Miller et al. [2]. Concentration and purity of each sample of the DNA obtained was quantified by use of a NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, USA) to determine its.

The *Leishmania infantum* (Linf.1-23F 5'-TCCCAAACCTTTTCTGGTCCT-3' and Linf.1-154R 5'-TTACACCAACCCCCAGTTTC-3') primers used, with the expected 132 bp product and T_m=81°C, were described by Paiva-Cavalcanti et al. [3]. These primers target the conserved region of the *L. donovani* kinetoplast DNA.

First, a real time PCR was performed for confirmation of the animal positivity with respect to the presence of *L. infantum*. For absolute quantification, a positive control curve with a scale ranging from 1 fg to 1 ng of *L. infantum* (MHOM/BR/1974/PP75) genomic DNA (factor 10) was used. Non-template controls (NTC) with no DNA and canine DNA samples were included in duplicates.

The reactions were performed using the ABI PRISM 7500 real time PCR platform (Applied Biosystems, USA) in a final volume of 50 μL :2 μL of DNA, 21 μL of nuclease-free water (Type 1), 1 μL of each primer at 3 pmol and 25 μL of SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, USA). The amplification profile consisted of the following steps: initial denaturation at 95°C for 10 min, which was followed by 40 cycles of 95°C/15sec, 60°C/1 min. The 7500 Software (version 2.0.5) was used for data analysis. With regard to the amplification curve, all positive samples were evaluated by comparing them with the amplification cycles in which a positive control amplification curve was observed. Furthermore, samples were also evaluated in comparison to the negative control (no template control).

2.4. PANIAuNp hybrid composite preparation

PANIAuNp composites were obtained according to Nascimento and collaborators [13]. Initially, $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (0.81 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), aniline (0.030 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) and MPTS (6.46×10^{-2} $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) were inserted in a round bottom flask containing 20 mL ethanol under magnetic stirring (1,100 rpm) for 48 h. Finally, the MPTS excess was removed by centrifugation for 10 min (12,000 rpm) and 500 μL 0.1 M HCl were added, resulting in the MPTS hydrolysis and a positively charged nanocomposite [14].

2.5. Immobilization of DNA probe and hybridization with genomic DNA target

During the electrochemical experiments we have used a bare gold electrode ($\phi = 2 \text{ mm}$) polished with alumina powder ($0.05 \text{ }\mu\text{m}$), sonicated in ultrapure water ($18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$) for 10 min and air dried. After this, $2 \text{ }\mu\text{L}$ PANIAuNp was dropped on the electrode surface for 2 min. The sensor system was obtained by dropping $2 \text{ }\mu\text{L}$ *L. infantum* primer (LiP) on the previously modified electrode, which was then kept at room temperature for 20 min to dry. In addition, the specificity of the LiP-PANIAuNp-modified electrode was evaluated against the *L. infantum* DNA sequence and clinical samples from contaminated dogs (Fig. 1) at different concentrations during a fixed exposure time of 20 min.

2.4. Electrochemical measurements

Electrochemical data was obtained using a PGSTAT 128N potentiostat/galvanostat (Autolab, Eco-Chemie, Netherlands) interfaced with a computer-controlled analyzer. Electrochemical analysis were performed using a three-electrode system composed by a bare gold electrode (working electrode), platinum electrode (counter electrode) and Ag/AgCl saturated with KCl (reference electrode). Cyclic voltammetry (CV) measurements were performed at potential ranging from -0.2 to 0.7 V at a scan rate of $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. The EIS frequency was scanned in the 100 mHz - 100 kHz range with a 10 mV amplitude sine wave potential applied. A 10 mM $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (1:1) solution was used as a redox probe in a phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4) solution. All experiments were performed in triplicate using at least three different sensors at room temperature and inside a Faraday cage.

2.6. Scanning electron microscopy (SEM) characterization

Morphological analysis were performed using a JSM 5900 (JEOL instruments, Japan) at an acceleration voltage of 15 kV and with a working distance of 15 μm [15]. A thin gold layer was sputtered on the samples using a metal evaporator.

3. Results and Discussion

3.1. Morphological characterization of the biosensor

SEM technique was employed to confirm the fabrication process of the biosensor. While in Fig. 2a one can observe the presence of non-aggregated small particles corresponding to PANIAuNp-modified electrode, in Fig. 2b a heterogeneous morphology on the PANIAuNp-modified electrode after addition of the LiP was revealed. The LiG-LiP-PANIAuNp system demonstrated that a biomolecular interaction based on oligonucleotide complementary binding interactions does occur resulting in a complete covering of the sensor surface (Fig. 2c). The fact that the image of the negative control sample is quite similar to LiP-PANIAuNp system corroborates the idea of specificity of the sensor (Fig. 2d). These results were confirmed using CV and EIS techniques.

3.2. Cyclic voltammetry measurements

CV is a useful technique to monitor the electron transfer (ET) barrier between the solution species and sensor surface. ET occurs by tunneling through the barrier or through the defects in the barrier. The $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ redox pair was chosen as a marker to investigate the changes in the electrode behavior after each assembly step. As expected,

after the electrode surface modification the ET kinetics of $K_4[Fe(CN)_6]^{4+}/K_3[Fe(CN)_6]^{3-}$ is disrupted. Fig. 3 shows the cyclic voltammograms (CVs) for bare gold electrode (curve a), PANIAuNp-modified electrode (curve b), LiP-PANIAuNp-modified electrode at 10 min (curve c), 20 min (curve d), 30 min (curve e), 40 min (curve f) and 50 min (curve g) in a 10 mM $K_4[Fe(CN)_6]^{4+}/K_3[Fe(CN)_6]^{3-}$ PBS solution at a scanning rate of $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

As shown in Fig. 3 b, the stepwise assembly of different materials on gold electrode is accompanied by a decrease in the amperometric response of the electrode and an increase in the peak-to-peak separation between the cathodic and anodic waves of the redox probe. In particular, after interaction of LiP with the PANIAuNp, the peak current shows a quasi-reversible behavior (curves c-g). The reason for this is that the LiP adsorbed on PANIAuNp acts as an inert electron and mass transfer blocking layer, hindering the movement of ferricyanide toward the electrode surface. In addition, this behavior is proportional to the time. Fig. 3 c revealed the LiP-PANIAuNp interaction with positive genome Leishmania at different concentrations demonstrating the hybridization process. A decreasing in the total amperometric response is noted when the LiP-PANIAuNp system was tested at higher genome concentration. In addition, negative genome exhibited an insignificant hybridization response when compared with LiP-Genome.

The presence of the PANIAuNp hybrid composite is essential for the actual operation of the biosensor since it can act both as a support for the biological material and also as the active transducer agent. Of one should also note that the oligonucleotide sequences attached to the nanoparticles surface maintain their hybridization capabilities [16].

3.3. Electrochemical impedance spectroscopic measurements

EIS has been extensively used as a promising method for development of genosensors, since the technique can be readily miniaturized to perform fast analysis with high sensitivity [17]. It is important to note that the electron transfer resistance (R_{CT}) controls the electron transfer kinetics of the redox-probe at the electrode interface and that, in general, its magnitude varies in accordance with the adsorption of different materials.

The impedimetric response of the bare gold electrode is shown in Fig. 4a (curve a). The measured semicircle is very small, implying a very low resistance ($R_{CT} = 0.19$ k Ω) for the redox-probe dissolved in the electrolyte solution. Subsequently, there occurs the PANIAuNp adsorption on the gold electrode, with the resulting assembled layers showing a higher interfacial $R_{CT} = 0.89$ k Ω (Fig. 4a, curve b), in an indication that the hybrid composite partially inhibited the electron transfer of the electrochemical probe. However, the interfacial resistance of the LiP-PANIAuNp-modified gold electrode increases ($R_{CT} = 1.85$ k Ω), due to the presence of the probe molecules that hinder the electron transfer at the electrode surface/electrolyte interface (Fig. 4a, curve c).

In Fig. 4b we show the impedance responses of the LiP-PANIAuNp modified electrode in 10 mM $K_4[Fe(CN)_6]^{4-}/K_3[Fe(CN)_6]^{3-}$ PBS solution at different concentrations of LiG, as a manner to evaluate the recognition ability of the biosensor.

The total impedance is determined by important parameters as electrolyte resistance (R_{Ω}), constant phase element (Q), charge transfer resistance (R_{CT}) and the Warburg element (Z_w). A modified Randles equivalent circuit (Fig. 4c) was chosen to fit the experimental results since it can provide more detailed information on the impedimetric behavior of the biosensor [18].

R_{Ω} and Z_w are not affected by chemical modifications at the electrode interface and represent bulk properties of the electrolyte solution and diffusion of the applied redox probe, respectively. In addition, the R_{CT} values depend on insulating features at the electrode/electrolyte interface. Furthermore, the Q value depends on the surface area of the electrode, on the thickness of the separation layer and on the dielectric constant of the layer separating ionic charges from the electrode surface. The changes in R_{CT} are more representative than those in other impedance components. In order to view the primer-genome interaction, we considered the relation between R_{CT} and the genomic target concentration. In Table 1 we list the parameters of the fitted impedance results. The sequence of measurements shows an additional blockage of the interface after each step, confirming that the amount of material immobilized on the electrode surface directly correlates with the measured impedance. After the hybridization between the probe and the genomic target, a significant increase in R_{CT} to 12.60 k Ω can be observed at the different concentrations of genome evaluated [18].

Thus, it can be observed that the hybridization occurs and the complete system maintains its biological recognition activity after several steps of modification of the electrode surface. The impedance response can be quantitatively assessed in terms of the R_{CT} by

$$\Delta R_{CT}(\%) = \frac{R_{CT}(PL-G) - R_{CT}(PL)}{R_{CT}(PL)} \quad ,$$

where $R_{CT}(PL)$ is the value of the electron transfer resistance of the LiP-PANIAuNp-modified electrode before contacting the genomic target. $R_{CT}(PL-G)$ is the value of the electron transfer resistance of the LiG-LiP-PANIAuNp-modified electrode after its exposure to solutions containing the genomic target at different concentrations.

The results in Fig. 4d show that biosystem was able to recognize the genomic target at different concentrations, a result that also can be seen by the evident increase in the charge transfer resistance value ΔR_{CT} with the genome concentration, indicating that the hybridization process can be sensed by the modified electrode.

3.4. Biodetection of *Leishmania infantum* in clinical isolates

After confirmation of the biosensor applicability, we performed analysis with sera of dogs contaminated with *L. infantum* for the recognition of the genomic target [5]. In Fig. 5 we present the response of the LiP-PANIAuNp in presence of complementary DNA target sequence of *L. infantum* in canine serum. The electrochemical response of LiP-PANIAuNp hybridized with different concentrations of 0.01 pg mL^{-1} , 0.1 pg mL^{-1} , 0.01 ng mL^{-1} , 0.1 ng mL^{-1} , 1 ng mL^{-1} and 10 ng mL^{-1} of genomic target has been studied by CV and EIS (Fig. 5).

It has been observed that the magnitude of the current decreases with the increase of target genomic DNA concentration (Fig. 5a). This may be explained by taking into account that the enhanced number of DNA molecules at the surface of the bioelectrode results in steric inhibition of the redox indicator. The sensor exhibited linearity in a wide range of concentrations with a detection level of 0.01 pg mL^{-1} and acceptable reproducibility with a relative standard deviation of $\sim 5\%$. In Fig. 5b we show the impedance response of the LiP-PANIAuNp after contact with the LiG of canine sera at different concentrations. The diameter of the semicircle was higher for canine contaminated serum than for negative serum. The impedance results shown in Fig. 5c may be interpreted in terms of the variation in the electron transfer resistance across the interface. A summary of these results is given in Table 2 for different concentrations of positive and negative canine serum.

The sensitive relationship existing between the electron transfer rate and the observed responses of the interaction between antibody-antigen directly was manifested in the corresponding values R_{CT} and k^0 . The existence of the semicircle is evidence of a heterogeneous charge transfer kinetics, according to

$$R_{CT} = RT/nFk^0 \quad (1)$$

$$i^0 = nFAk^0C \quad (2)$$

where i^0 is the charge transfer rate constant and C is the concentration of the redox couple [19].

The compact target–genome complex introduces an insulating layer on the modified surface, and this is transduced as an increased diameter of the semicircle, resulting in a high R_{CT} , while the charge transferring rate constant k^0 decreases from 15.7×10^{-6} m/s to 0.79×10^{-6} m/s. In this manner, the biodevice so constructed has potential to be used as an efficient analytical probe in the primary points-of-care for the molecular diagnosis of *L. infantum* infection.

4. Conclusion

An effective genosensor based on PANIAuNp composite has been developed for diagnosis of *L. infantum* infection. The LiP immobilized on PANIAuNp was used as the sensing material to capture genomic target. Electrochemical impedance spectroscopy and cyclic voltammetry measurements reveal the existence of a direct and reproducible stable correlation between the values of the obtained signals and the probed genome concentrations. The final system showed satisfactory results and confirms its adequate efficiency for the diagnosis of *L. infantum*. In fact, this biosensor effectively detects Leishmaniasis in minutes using small volumes of sample as compared to standard alternative techniques.

5. Acknowledgements

The authors are grateful for the support provided by the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Rede ELINOR de Nanobiotecnologia/CAPES, MCT/FINEP and Department of Chemistry of the Federal University of Pernambuco for the SEM images. Garcia would like to thank CAPES for a MSc fellowship.

Table Captions

Table 1

Values of the equivalent circuit elements from fitted impedance results.

Modified electrode	Genome concentration (ng.mL⁻¹)	R_{CT}/kΩ	Q/μF	n	κ^o (10⁻⁶)	ΔR_{CT}%
Bare gold electrode	-	0.19	1.02	0.44	23.92	-
PANIAuNp	-	0.89	2.02	0.62	20.14	-
LiP-PANIAuNp	-	1.85	1.25	0.64	18.23	-
LiG-LiP-PANIAuNp	0.5	12.6	8.83	0.65	14.15	581.00
LiG-LiP-PANIAuNp	0.1	7.42	9.75	0.70	11.60	301.08
LiG-LiP-PANIAuNp	0.05	5.58	1.13	0.64	7.09	201.62
LiG-LiP-PANIAuNp	0.01	4.18	6.70	0.71	5.63	125.94
Negative Genome-LiP-PANIAuNp	0.5	2.79	4.75	0.57	5.39	50.81

Table 2

Values of the equivalent circuit elements from fitted impedance results for CS recognition.

Modified electrode	Genome concentration (ng.mL⁻¹)	R_{CT}/kΩ	κ^o (10⁻⁶)	ΔR_{CT}%
LiP-PANIAuNp	-	2.17	15.7	-
CS-LiP-PANIAuNp	0.0001	2.32	3.29	6.91
CS-LiP-PANIAuNp	0.001	3.08	2.48	42..3
CS-LiP-PANIAuNp	0.01	6.25	1.24	188.0
CS-LiP-PANIAuNp	0.10	8.53	1.22	293.0
CS-LiP-PANIAuNp	1.0	9.61	0.89	342.8
CS-LiP-PANIAuNp	10.0	29.6	0.79	380.6
NegativeCS-LiP-PANIAuNp	0.50	1.98	16.4	-2.47

*Values of the equivalent circuit elements from fitted impedance results.

Figure Captions

Figure 1. Schematic representation of the biosensor.

Figure 2. SEM topographic images of PANIAuNp (a), LiP-PANIAuNp (b), LiG-LiP-PANIAuNp (c) and Negative Genome-LiP-PANIAuNp (d).

Figure 3. Cyclic voltammograms of the electrode at different stages: Probe immobilization (a), steps of electrode modification (b) and evaluation of LiP-PANIAuNp at different genome concentrations (c). Supporting electrolyte 10mM $K_4[Fe(CN)_6]^{4-}/K_3[Fe(CN)_6]^{3-}$ 1:1 in 10 mM PBS pH 7.4 solution; scan rate of $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

Figure 4. Nyquist plot of the electrode at different stages (a); Bare gold electrode (●), PANIAuNp (●) and LiP-PANIAuNp (●), in presence of the redox pair of $K_4[Fe(CN)_6]^{4-}/K_3[Fe(CN)_6]^{3-}$ 1:1 in 10 mM PBS pH 7.4 solution. Evaluation of LiP-PANIAuNp at different genome concentrations (b); Modified Randles circuit (c) and circuit elements; R_Ω - electrolyte resistance, Q - constant phase element, R_{CT} - charge transfer resistance and Z_w - Warburg element. $\Delta R_{CT}\%$ for the systems that corresponded to the LiP-PANIAuNp-L. infantum genome at different concentrations (d).

Figure 5. Cyclic voltammograms (a) and Nyquist plots (b) demonstrating canine serum evaluation by LiP-PANIAuNp system at different concentrations ($0.1 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ – $10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$). Supporting electrolyte 10mM $K_4[Fe(CN)_6]^{4-}/K_3[Fe(CN)_6]^{3-}$ 1:1 in 10 mM PBS pH 7.4 solution; scan rate of $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. $\Delta R_{CT}\%$ (c) for the systems that corresponded to the LiP-PANIAuNp system for serum recognition.

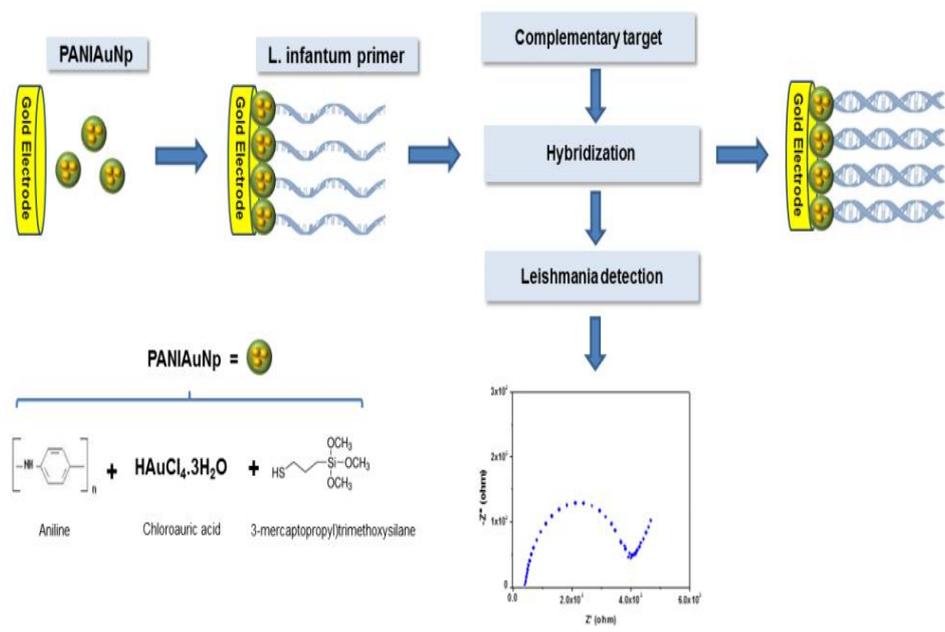


Fig. 1

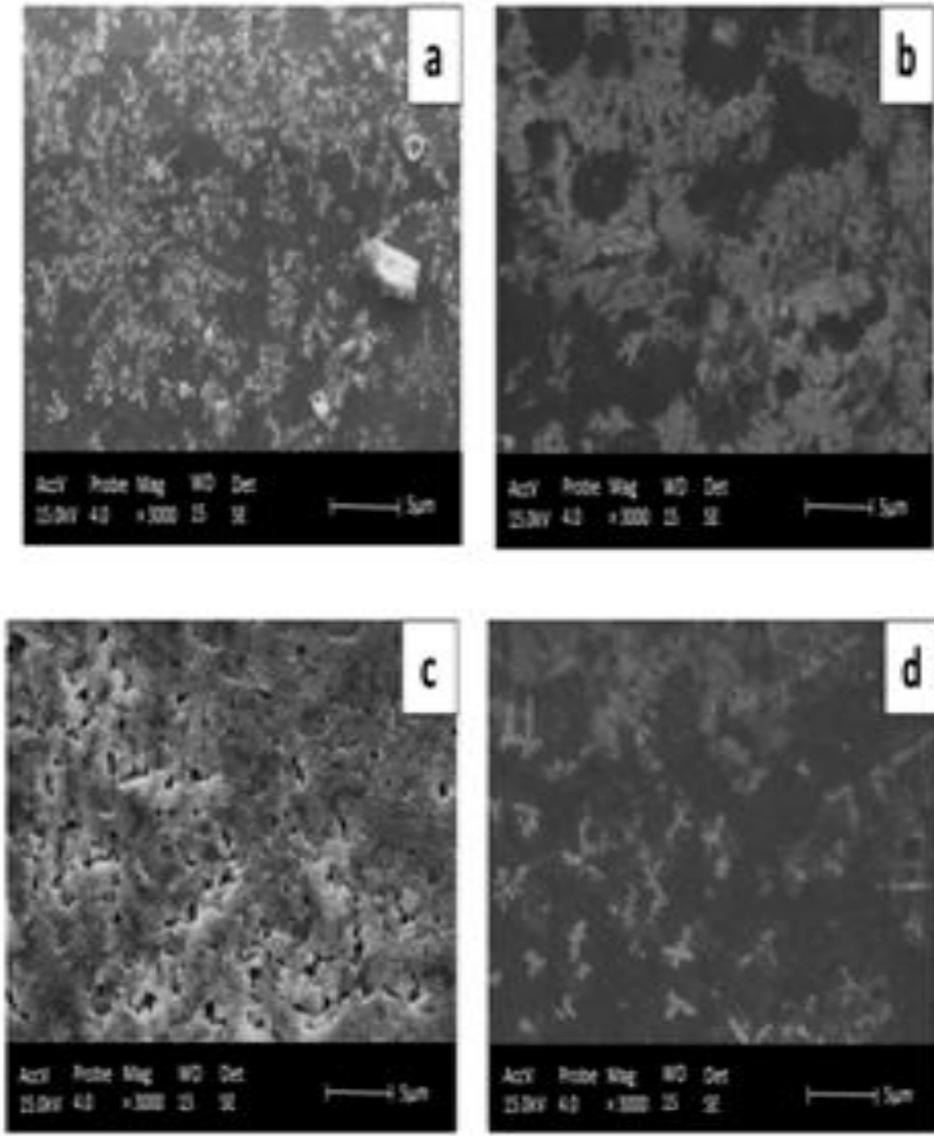


Fig. 2

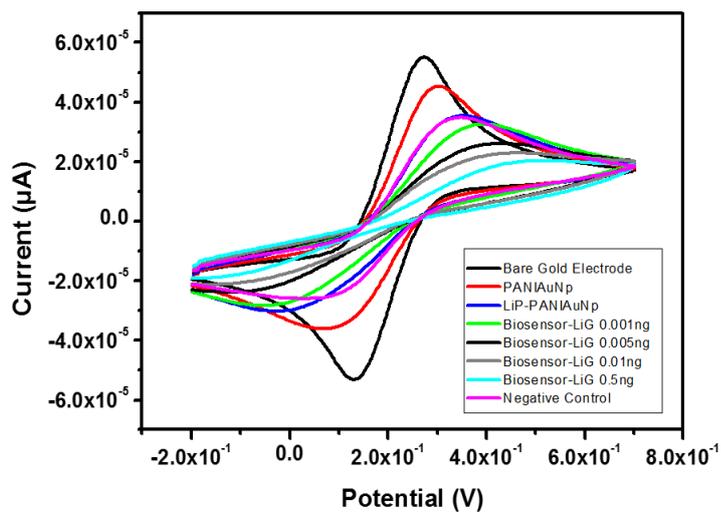
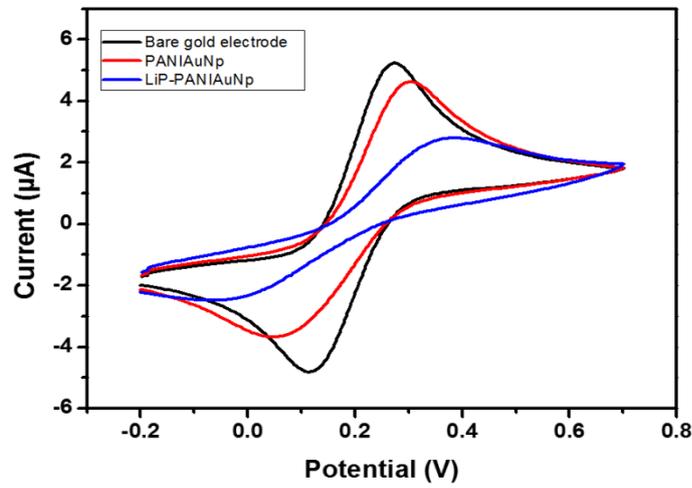
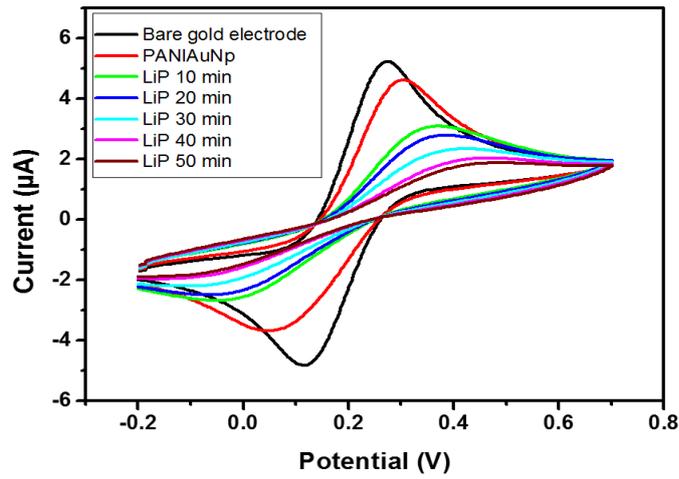
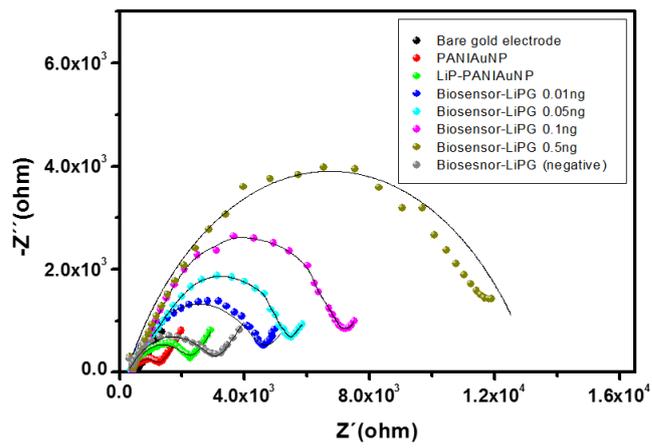
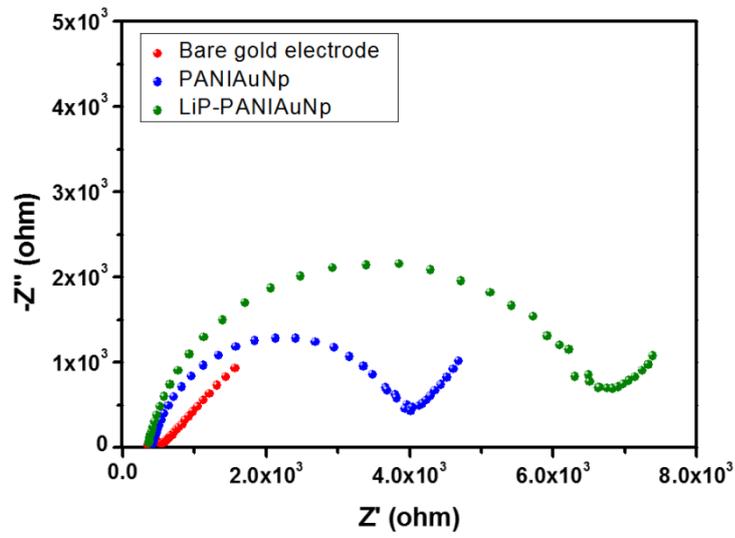


Fig. 3



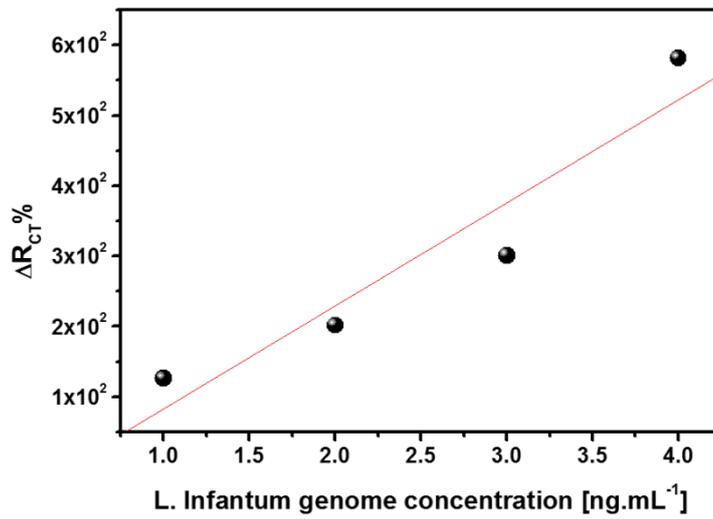
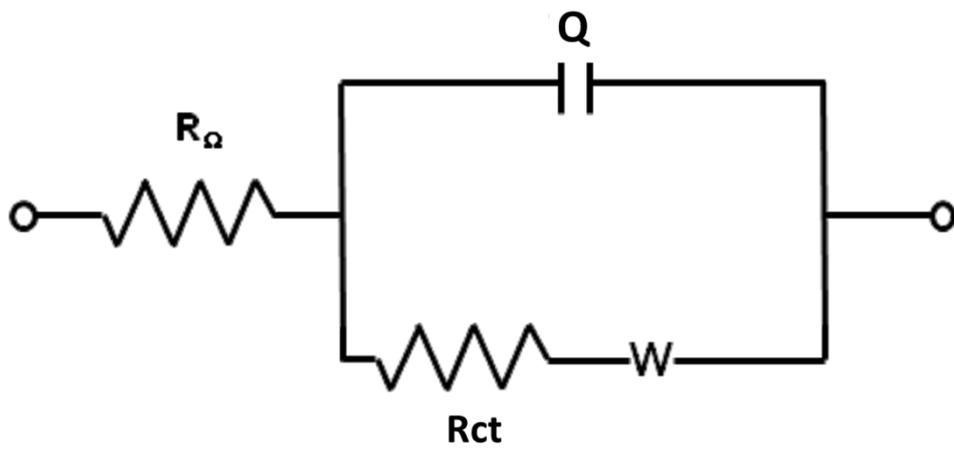


Fig. 4

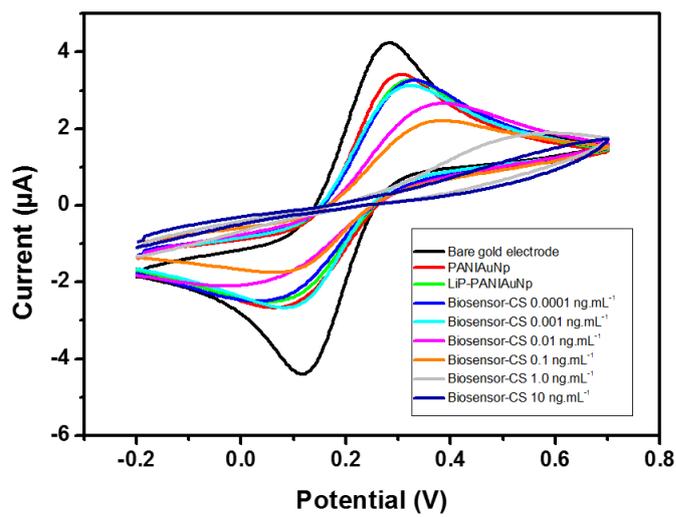
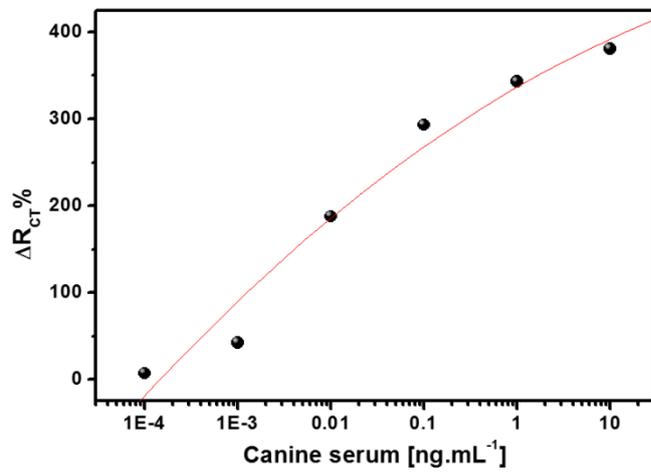
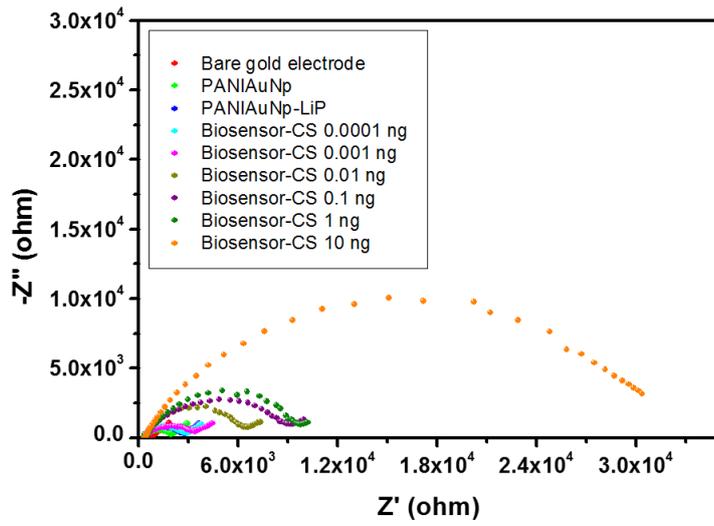


Fig. 5

References

- [1] D.E. Souto, J.V. Silva, H.R. Martins, A.B. Reis, R.C. Luz, L.T. Kubota, F.S. Damos, Development of a label-free immunosensor based on surface plasmon resonance technique for the detection of anti-*Leishmania infantum* antibodies in canine serum, *Biosen. Bioelectron.* 46 (2013) 22-29.
- [2] L.M.O. Diniz, H. Duani, C.R. Freitas, R.M. Figueiredo, C.C. Xavier, Neurological involvement in visceral leishmaniasis: case report, *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 43 (2010) 743–745.
- [3] A.B. Reis, O.A. Martins-Filho, A. Teixeira-Carvalho, R.C. Giunchetti, C.M. Carneiro, W. Mayrink, W.L. Tafuri, R. Correa-Oliveira, Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis, *Vet. Immunol. Immunopathol.* 128 (2009) 87-95.
- [4] C.M.F. Gontijo, M.N. Melo, Visceral Leishmaniasis in Brazil: current status, challenges and prospect, *Rev. Bras. Epidemiol.* 7 (2004) 338-349.
- [5] S. Mohan, P. Srivastava, S.N. Maheshwari, S. Sundar, R. Prakash, Nano-structured nickel oxide based DNA biosensor for detection of visceral leishmaniasis (Kala-azar), *Analyst* 136 (2011) 2845-2851.
- [6] C.M. Mugasa, T. Laurent, G.J. Schoone, F.L. Basiye, A.A. Saad, S. el Safi, P.A. Kager, H.D.F.H. Schallig, Simplified molecular detection of *Leishmania* parasites in various clinical samples from patients with leishmaniasis, *Parasite Vector* 3 (2010).
- [7] T.G. Drummond, M.G. Hill, J.K. Barton, Electrochemical DNA sensors, *Nat. Biotechnol* 21 (2003) 1192-1199.
- [8] L. Doleman, L. Davies, L. Rowe, E.A. Moschou, S. Deo, S. Daunert, Bioluminescence DNA hybridization assay for *Plasmodium falciparum* based on the photoprotein aequorin, *Anal. Chem.* 79 (2007) 4149-4153.

- [9] J. Zhang, S. Song, L. Zhang, L. Wang, H. Wu, D. Pan, C. Fan, Sequence-specific detection of femtomolar DNA via a chronocoulometric DNA sensor (CDS): effects of nanoparticle-mediated amplification and nanoscale control of DNA assembly at electrodes, *J. Amer. Chem. Soc.* 128 (2006) 8575-8580.
- [10] D. Xue, C.M. Elliott, P. Gong, D.W. Grainger, C.A. Bignozzi, S. Caramori, Indirect electrochemical sensing of DNA hybridization based on the catalytic oxidation of cobalt (II), *J. Amer. Chem. Soc.* 129 (2007) 1854-1855.
- [11] K. Ravindranadh, M.C. Rao, Physical properties and applications of conducting polymers: An Overview, *Int. J. Adv. Pharm. Biol. Chem.* 2 (2013) 190-200.
- [12] F.F. Fang, H.J. Choi, J. Joo, Conducting polymer/clay nanocomposites and their applications, *J. Nanosc. Nanotechnol.* 8 (2008) 1559-1581.
- [13] H.P. Nascimento, M.D. Oliveira, C.P. de Melo, G.J. Silva, M.T. Cordeiro, C.A. Andrade, An impedimetric biosensor for detection of dengue serotype at picomolar concentration based on gold nanoparticles-polyaniline hybrid composites, *Col. Surf. B Biointerf.* 86 (2011) 414-419.
- [14] C.P. de Melo, C.G. dos Santos, C.A.S. Andrade, US Patent PCT/BR2009/000117, (2009).
- [15] H.P. de Oliveira, C.A. Andrade, C.P. de Melo, Electrical impedance spectroscopy investigation of surfactant-magnetite-polypyrrole particles, *J. Coll. Interf. Sci.* 319 (2008) 441-449.
- [16] E.M.B. Brown, T. Paunesku, K.A. Wu, T. Thurn, B. Haley, J. Clark, T. Priester, G.E. Woloschak, Methods for assessing DNA hybridization of PNA-TiO₂ nanoconjugates, *Anal. Biochem.* 383 (2008) 226-235.

- [17] I.O. K'Owino, O.A. Sadik, Impedance spectroscopy: A powerful tool for rapid biomolecular screening and cell culture monitoring, *Electroanalysis* 17 (2005) 2101-2113.
- [18] O.Y.F. Henry, S. Kirwan, A.M. Debela, C.K. O'Sullivan, Electrochemical genosensor based on three-dimensional DNA polymer brushes monolayers, *Electrochem. Comm.* 13 (2011) 1155-1158.
- [19] M.D.L. Oliveira, D.S.P. Abdalla, D.F. Guilherme, T.E.S. Faulin, C.A.S. Andrade, Impedimetric immunosensor for electronegative low density lipoprotein (LDL-) based on monoclonal antibody adsorbed on (polyvinyl formal)-gold nanoparticles matrix, *Sens. Act. B Chem.* 155 (2011) 775-781.

8. CONCLUSÕES

- As análises realizadas de VC e EIE indicaram a imobilização correta do sistema sensor PANIAuNps-Primer-SondaLeish na superfície do eletrodo de ouro por etapa de adsorção do analito.
- As análises realizadas de VC e EIE para os sistemas PANIAuNps-Primer-SondaLeish, indicaram uma resposta satisfatória para o sistema PANIAuNps-Primer-SondaLeish, pois em VC obteve uma transferência eletrônica satisfatória e na EIE um aumento da resposta na resistência de carga.
- As imagens de MEV confirmam a modificação da superfície do sistema PANIAuNps-Primer-SondaLeish
- O sistema desenvolvido PANIAuNps-Primer-SondaLeish tem a vantagem de detecção da *Leishmania infantum* em pequenas quantidades (picograma).
- Estes resultados indicam a adequação do biossensor para aplicações práticas

9. PERSPECTIVAS FUTURAS

Desta forma, o presente estudo fornece os insumos necessários para o desenvolvimento de biossensores impedimétricos para ácidos nucleicos e também informações físico-químicas sobre o reconhecimento do genoma de *L. infantum* na superfície sensora. Esse estudo de base serve como orientação para desenvolvimento de novos sensores para Leishmaniose baseado na imobilização de nanocompósito de ouro e polianilina. Nos próximos estudos serão analisadas, outras superfícies sensoras visando baixar o limite de detecção, e aperfeiçoamento da plataforma, como também novas análises mais aprofundadas utilizando microscopia de força atômica e microscopia de transmissão.