



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Centro de Biociências
Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

MARIA FLÁVIA KAROLINE DOS SANTOS GARCIA

Plataformas nanoestruturadas para o diagnóstico de *Leishmania*
chagasi a partir do uso de nanopartículas magnéticas, filme
eletrodepositado de magnetita/quitosana/polianilina e nanopartículas
de ZnO

Recife
2018

MARIA FLÁVIA KAROLINE DOS SANTOS GARCIA

Plataformas nanoestruturadas para o diagnóstico de *Leishmania chagasi* a partir do uso de nanopartículas magnéticas, filme eletrodepositado de magnetita/quitosana/polianilina e nanopartículas de ZnO

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Doutora em Inovação Terapêutica.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Danielly Lima de Oliveira
Coorientador: Prof. Dr. Cesar Augusto de Souza Andrade

Recife
2018

Catálogo na fonte
Elaine C Barroso
(CRB4 1728)

Garcia, Maria Flávia Karoline dos Santos

Plataformas nanoestruturadas para o diagnóstico de *Leishmania chagasi* a partir do uso de nanopartículas magnéticas, filme eletrodepositado de magnetita/quitosana/polianilina e nanopartículas de ZnO / Maria Flávia Karoline dos Santos Garcia. – 2018.

120 f.: fig., tab.

Orientadora: Maria Danielly Lima de Oliveira

Coorientador: Cesar Augusto de Souza Andrade

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, 2018.

Inclui referências.

1. Nanotecnologia 2. Leishmaniose 3. Polímeros I. Oliveira, Maria Danielly Lima de (orient.) II. Andrade, Cesar Augusto de Souza (coorient.) III. Título

620.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2020-075

MARIA FLÁVIA KAROLINE DOS SANTOS GARCIA

Plataformas nanoestruturadas para o diagnóstico de *Leishmania chagasi* a partir do uso de nanopartículas magnéticas, filme eletrodepositado de magnetita/quitosana/polianilina e nanopartículas de ZnO.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Doutora em Inovação Terapêutica.

Aprovada em: 12/ 12/ 2018

Banca Examinadora

Profa. Dra. Maria Danielly Lima de Oliveira (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco- UFPE

Prof. Dr. Cesar Augusto de Souza Andrade (Coorientador)
Universidade Federal de Pernambuco- UFPE

Prof. Dr. Kleber Gonçalves Bezerra Alves (Examinador externo)
Universidade Federal de Pernambuco- UFPE

Profa. Dra. Marcia Bezerra (Examinador externo)
Universidade Federal de Pernambuco- UFPE

Prof. Dr. Rafael Ramos da Silva (Examinador externo)
Universidade Federal de Pernambuco- UFPE

Aos meus pais, Waltrupes e Ednalva,
... por todo apoio, amor e paciência...

Ao meu namorado Marcos
Vinicius, por todo carinho
e companheirismo...

...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 e dedicação nesse período de tanta importância na minha vida, obrigada por todas as palavras e atitudes de apoio e por estar sempre comigo!

À minha orientadora Prof^a Maria Danielly, pela sua forma de orientar, ensinar, ajudar, por acreditar em mim, e principalmente por toda paciência diante de minhas inúmeras falhas. 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 meu trio do ciúme, inseparável, minhas madrinhas, Giselle e Kalline, agradeço a Deus por existir pessoas na minha vida igual a vocês, por todos os momentos que dividimos juntas, experimentos no laboratório, congressos, saídas, viagens, conselhos, conversas, almoços e por tudo. Obrigada!

As minhas amigas Karen e Maurilia, as quais eu tive o imenso prazer de conviver desde que cheguei ao Bionano. Obrigada por toda acolhida e amizade.

Aos meus amigos do laboratório, obrigada por toda nossa convivência diária, conversas, brincadeiras, ajuda.

À FACEPE pelo apoio Financeiro.

Aos professores, colegas e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica. E a todos que não citei aqui, mas tiveram uma grande importância no desenvolvimento deste trabalho!

Obrigada!

**“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 23:1

RESUMO

A *Leishmania* é um gênero de protozoários da família Trypanosomatidae, que inclui os parasitas causadores das leishmanioses. A leishmaniose visceral é transmitida ao homem por insetos vetores ou transmissores, conhecidos como flebotomíneos. É causada por espécies do gênero *Leishmania*, pertencentes ao complexo donovani. É uma zoonose que representa um problema sério de saúde pública com várias manifestações clínicas que dependem da espécie. O objetivo deste estudo foi desenvolver um biossensor utilizando filme eletrodepositado de magnetita/quitosana/polianilina (Fe_3O_4 -Quit-PANI). O filme de Fe_3O_4 -Quit-PANI foi eletrodepositado, por meio da técnica de voltametria cíclica (VC). O filme revelou a presença de picos característicos revelados no voltamograma. O compósito Fe_3O_4 Nps-Quit-PANI exibiu correntes mais elevadas do que o compósito Quit-PANI, indicando que as nanopartículas favorecem a um incremento na área superficial efetiva do eletrodo. A obtenção do sistema sensor Fe_3O_4 Nps-Quit-PANI-Primer_{Leishmania} foi possível devido à adsorção física do primer que servirá como molécula de bioreconhecimento para fitas complementares presentes em material genômico do verme e material genômico extraído do soro de cães infectados. Os testes de sensibilidade do sistema sensor Fe_3O_4 Nps-Quit-PANI-Primer_{Leishmania} frente ao DNA genômico em diferentes concentrações revelou uma redução na magnitude das correntes de pico, demonstrando a hibridação específica. Em adição, o sistema Fe_3O_4 Nps-Quit-PANI-Primer_{Leishmania} ao ser exposto à soro de cães infectados com Leishmaniose revelou boa sensibilidade de detecção em diferentes concentrações do material teste (1ng/uL, 0,1 ng/uL, 0,01 ng/uL, 0,001 ng/uL e 0,0001 ng/uL). Desta forma, o sistema Fe_3O_4 Nps-Quit-PANI-Primer_{Leishmania} é viável para a biodetecção de *Leishmania* em soro de cães infectados.

Palavras-chave: Biossensor. Nanopartículas. Polímeros. Voltametria. Impedância.

ABSTRACT

Leishmania is a genus of protozoa of the family Trypanosomatidae, which includes the parasites that cause leishmaniasis. Visceral leishmaniasis is transmitted to man by insect vectors or transmitters known as sandflies. It is caused by species of the genus Leishmania, belonging to the donovani complex. It is a well-publicized zoonosis, which represents a serious public health problem with several clinical manifestations that depend on the species.. The objective of this study was to develop a biosensor using magnetite/chitosan/polyaniline electrodeposited film (Fe_3O_4 -Quit-PANI). The Fe_3O_4 -Quit-PANI film was electrodeposited by means of the cyclic voltammetry (VC) technique. VC analysis revealed a presence of characteristic peaks in electrodeposited film. The Fe_3O_4 Nps-Quit-PANI composite exhibited higher currents than the Quit-PANI composite, indicating that nanoparticles favor an increase in the effective surface area of the electrode. Obtaining Fe_3O_4 Nps-Quit-PANI-PrimerLeishmania sensor system is accessible to the physical adsorption of the primer that serves as a bio-recognition molecule for complementary ribbons present in worm genomic material and genomic material extracted from the serum of infected dogs. Sensitivity testis of Fe_3O_4 Nps-Quit-PANI-Primer_{Leishmania} sensor system against genomic DNA at different concentrations revealed a reduction in magnitude of peak currents, demonstrating a specific hybridization. In addition, the Fe_3O_4 Nps-Quit-PANI-Primer_{Leishmania} system on exposure to sera from dogs infected with Leishmaniasis revealed good detection sensitivity at different test material concentrations (1 ng / ml, 0.1 ng / ml, 0.01 ng / μL , 0.001 ng / μl and 0.0001 ng / μl). Thus, Fe_3O_4 Nps-Quit-PANI-Primer_{Leishmania} system is feasible for a Leishmania biodetection in sera from infected dogs

Keywords: Biosensor. Nanoparticles. Polymers. Voltametric.Impedimetric.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Mosquito palha.....	22
Figura 2- Ciclo do flebotomíneo. Forma amastigota e promastigota.....	23
Figura 3- Esquema de Funcionamento de um Biossensor.....	28
Figura 4- Classificação dos transdutores.....	30
Figura 5- Estrutura dos ácidos nucleicos	32
Figura 6- Esquema ilustrativo dos quatro tipos básicos de métodos de imobilização: a) adsorção, b) encapsulação, c) ligação covalente e (d)ligação covalente cruzada.....	34
Figura 7- Comparação do tamanho de nanopartículas.....	35
Figura 8- Estrutura geral da Polianilina (PAN), mostrando as unidades reduzidas (ganha elétrons) e oxidadas (perde elétrons).....	36
Figura 9- Os estados de oxidação mais importantes da polianilina: leucoesmeraldina, esmeraldina	37
Figura 10- Estrutura Química da Quitosana.....	38
Figura 11- Visão geral da aplicação das nanopartículas magnéticas.....	40
Figura 12- Processo de eletropolimerização.....	43
Figura 13- Voltamograma Cíclico.....	45
Figura 14- Circuito do tipo Randles (no topo) e sua resposta idealizada no plano de impedância complexa	47
Figura15- Funcionamento microscopia de força atômica.....	49

Figura 16 - Representação esquemática dos modos de operação em AFM: (a) modo contato, (b) modo não- contato e (c) modo intermitente.....	50
Figura 17- Potenciostato e Célula eletroquímica convencional de três eletrodos: trabalho, referência e contra-eletrodo.....	53
Figura 18- Reresentação esquemática sistema sensor NpsFe ₃ O ₄ /Quit/PANI- Primer _{Leishmania}	73
Figura 19- Sistema sensor NpsFe ₃ O ₄ /Quit/PANI-Primer _{Leishmania}	74
Figura 20- Teste do sistema sensor NpsFe ₃ O ₄ /Quit/PANI-Primer _{Leishmania} frente as amostras dos genomas dos cães.....	74
Figura 21- Teste do sistema sensor NpsFe ₃ O ₄ /Quit/PANI-Primer _{Leishmania} frente as amostras de cães contaminados com leishmaniose.....	75
Figura 22- concentração do analito alvo com as magnitudes da corrente de pico anódica extraída.....	75
Figura 23- Microscopia de força atômica.....	76
Figura: 24- Estudo de interferentes do sistema Nps Fe ₃ O ₄ /Quit/PANi utilizando glicogênio.....	77
Figura 25- Estudo de interferentes do sistema Nps Fe ₃ O ₄ /Quit/PANi utilizando colesterol.....	77
Figura 26- Estudo de interferentes do sistema Nps Fe ₃ O ₄ /Quit/PANi utilizando ácido ascórbico.....	78
Figura 27- Estudo de interferentes do sistema Nps Fe ₃ O ₄ /Quit/PANi utilizando n-acetilglicosamina.....	78

Figura 28- Estudo do sistema Nps Fe_3O_4 /Quit/PANi, utilizando amostra negativa.....	79
Figura 29- Estudo do sistema Nps Fe_3O_4 /Quit/PANi, realizando teste de hibridização.....	79
Figura 30- Representação esquemática do sistema AMP-ZnONH ₃ -Primer _{Leishmania}	99
Figura 31- a) VC do sistema AMP-ZnONH ₃ -Primer _{Leishmania} b) EIE do sistema AMP-ZnONH ₃ -Primer _{Leishmania}	100
Figura 32- a) VC do sistema AMP-ZnONH ₃ -Primer _{Leishmania} quando submetido a amostra de cães contaminados.....	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Comparação entre os componentes de cada invento	63
Tabela 2- Correntes de pico	80
Tabela 3- Comparação entre os componentes de cada invento	86

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

PANI	Polianilina
FACEPE	Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia de Pernambuco
PPGIT	Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica
VC	Voltametria Cíclica
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
DNA	(do inglês, deoxyribonucleic acid)
EIE	Espectroscopia de Impedância Eletroquímica
LV	Leishmaniose Visceral
NpsFe ₃ O ₄	Nanopartículas óxido de Ferro
AMP	Ácido mercaptopropiônico
Nps	Nanopartículas
ZnO ₃ NH ₃	Óxido de Zinco e Amônia
AFM	(do inglês, atomic force microscopy)

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Por cento
μm	Micrômetro
N	Newton
M	Micro
Ω	Ohm
V	Volts
μg	Micrograma

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.2	Objetivos	20
1.2.1	Geral	20
1.2.3	Específicos	20
2	REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1	Histórico	21
2.2	Agente etiológico e transmissão	21
2.3	Epidemiologia	24
2.4	Sintomas	25
2.5	Métodos de diagnóstico e tratamento	25
2.6	Biossensor	27
2.6.1	Classificação dos Biossensores	28
2.6.2	Biossensores quanto ao elemento de reconhecimento biológico	29
2.7	Genossensor	31
2.7.1	Uso e aplicações	31
2.8	Modificações de superfícies sensoras	34
2.8.1	Nanopartículas	34
2.8.2	Polianilina e Quitosana aplicações no desenvolvimento de biossensores	36
2.8.3	Nanopartículas de óxido de ferro e biossensores	38
2.8.4	Nanopartículas de óxido de zinco	41
2.8.5	Eletropolimerização como estratégia para construção de biossensores	42
2.9	Métodos Eletroquímico	44
2.9.1	Voltametria Cíclica	44
2.9.2	Espectroscopia de Impedância Eletroquímica	45

2.10	Análise Morfológica	48
2.10.1	Miscroscopia de Força Atômica	48
3	METODOLOGIA	53
3.1	Materiais	53
3.2	Equipamentos	53
3.3	Síntese e preparação das Nps Fe_3O_4	54
3.4	Síntese Nps $\text{ZnO}_3 \text{NH}_3$	54
3.5	Preparação do sistema Nps Fe_3O_4 /Quit/PANI-Primer _{Leishmania}	54
3.6	Preparação do sistema AMP-Zno NH_3 -Primer _{Leishmania}	55
3.7	Análise dos sistemas Nps Fe_3O_4 /Quit/PANI-Primer _{Leishmania} e MPA- Zno NH_3 -Primer _{Leishmania}	55
3.8	Medidas Eletroquímicas	56
3.9	Caracterização Morfológica	56
4	RESULTADOS PLATAFORMA 1 E PATENTE	57
4.1	Patente	57
4.2	Estudo de interferentes sistema Nps Fe_3O_4 /Quit/PANi	77
5	RESULTADOS PLATAFORMA 2 E PATENTE	81
5.1	Patente	81
6	CONCLUSÕES	102

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 (Souto et al, 2013). A transmissão acontece quando uma fêmea infectada passa o protozoário a uma vítima sem a infecção, enquanto se alimenta de seu sangue (Diniz et al, 2010). 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* (Souto et al, 2013). É uma zoonose largamente disseminada, que representa um problema sério de saúde pública com várias manifestações clínicas que dependem da espécie. Além disso, a leishmaniose destaca-se como a segunda causa de mortalidade dentre doenças negligenciadas (Reis et al, 2009). O número de cães infectados constitui um problema na transmissão da infecção para humanos. Aspectos clínicos para o diagnóstico são de extrema importância devido à presença de sinais e sintomas inespecíficos em oligossintomáticos (Gontijo et al, 2004).

Os exames parasitológicos são considerados métodos de referência no diagnóstico da LV, ainda que requeiram procedimentos invasivos e a necessidade de profissionais experientes. São ainda procedimentos que demandam trabalho intensivo 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 (Reis et al, 2009). 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 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 (Gontijo et al, 2004).

Além disso, vários testes como o ELISA, imunofluorescência e ensaios imunocromatográficos destinam-se para o diagnóstico da LV

(Gontijo et al, 2004).

No entanto, os testes supracitados apresentam como principal limitação a reação cruzada com outras parasitoses e baixa sensibilidade na detecção de casos assintomáticos. Dessa forma o desenvolvimento de novas ferramentas de detecção da *L. chagasi* de forma rápida e sensível é de extrema importância, destacando-se o desenvolvimento de biossensores eletroquímicos impedimétricos e voltamétricos (Mohan et al, 2011).

Biossensores são pequenos dispositivos que utilizam componentes biológicos como elementos de reconhecimento de outros representantes biológicos, como vírus, bactérias, fungos ou mesmo células cancerígenas. 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 (Mugasa et al, 2010).

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 (Mohan et al, 2011).

O presente trabalho refere-se a duas plataformas, onde a primeira baseia-se na aplicação de uma sequência curta de oligonucleotídeos (sonda de DNA) ligados eletrostaticamente a superfície de nanopartículas de magnetita (NpsFe_3O_4), quitosana, polianilina e a segunda utilizando também sonda de DNA, ácido mercaptopropiônico, EDC NHS e ZNO_3NH_3 , para detecção de patógenos em amostras com baixas concentrações (Zhang et al, 2006).

A modificação da superfície do eletrodo, com nanopartículas metálicas tem levado ao desenvolvimento de vários sensores eletroquímicos. Nanopartículas de óxido de ferro (Fe_3O_4) apresentam propriedades como aumento da área de superfície, magnetismo, redução química, ligante e características ópticas (Fang et al, 2008) Além disso, tem diversas outras vantagens entre elas a capacidade de associação a outras

nanopartículas metálicas sem alterar suas propriedades. No desenvolvimento de biossensores utilizando DNA essas nanopartículas têm sido utilizadas diante de suas excelentes propriedades (Xui et al, 2007).

A quitosana é um biopolímero natural, abundante que apresenta excelente capacidade de formação de filme, baixa toxicidade, boa permeabilidade em água e

Em adição, a segunda parte deste trabalho se objetiva em utilizar ácido mercaptopropiônico e nanopartículas de óxido de zinco aminada (ZnONps). O ácido mercaptopropiônico diante de suas adequadas propriedades vem sendo muito utilizado para fazer automontagem de camadas para desenvolvimento de biossensores (Doleman et al, 2007). Além disso, as nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) têm atraído cada vez mais atenção das indústrias e pesquisadores no sentido de desenvolver aplicações inovadoras com este nanomaterial em áreas como a da saúde e de alimentos (Doleman et al, 2007). Entre as inúmeras vantagens do seu uso, por ser excelente bactericida e fungicida, as ZnONps se destacam por serem biocompatíveis (Drummond et al, 2003).

1.2 Objetivos

1.2.1 Geral

- Caracterização impedimétrica e voltamétrica dos sistemas NPs-Fe₃O₄/ Quitosana/PANI e AMP-ZnONH₃ visando o desenvolvimento de biodispositivos nanoestruturados para a identificação de *L. chagasi*.

-

1.2.3 Específicos

- Avaliação físico-química dos parâmetros relacionados às etapas de modificação da superfície do eletrodo metálico;
- Determinação de parâmetros físico-químicos da sonda de Leishmania aminada e não-aminada, a qual será utilizada como elemento de biodeteção;
- Avaliação das características eletroquímicas da interação das sondas de *L. chagasi* com o sistema NPs-Fe₃O₄/ Quit/ PANI e AMP-ZnONH₃.
- Estudo das propriedades interfaciais dos sistemas NPS-Fe₃O₄/ Quit/ PANI- Sonda_{Leish} e AMP-ZnONH₃-Sonda_{Leish}, bem como avaliação da bioatividade deste sistema frente a amostras do genoma de *L. chagasi* isolado de amostras clínicas;
- Análise morfológica e estrutural dos filmes biológicos de NPS-Fe₃O₄/Quit/PANI-Sondas_{Leish} e NPS-Fe₃O₄/Quit/PANI-Sondas_{Leish}-Genoma por microscopia de força atômica;
- Análise morfológica e estrutural dos filmes biológicos de AMP-ZnONH₃- Sonda_{Leish}, AMP-ZnONH₃-Sonda_{Leish}Genoma por microscopia de força atômica;
- Determinação da capacitância da dupla camada elétrica (Cdl) através de cálculos teóricos a partir de resultados experimentais e da resistência à transferência de carga (Zre);
- Determinação das correntes de pico anódicas (ipa) e catódicas (ipc) dos voltamogramas cíclicos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1.Histórico

A primeira descrição da Leishmaniose Visceral (LV) foi na Grécia, em 1835 onde anteriormente era conhecida como “ponos” (Deus da dor, na mitologia grega). Em 1869 foi denominada na Índia de “Kala-jwar” (febre negra) ou “Kala-azar” (Calazar) em virtude do escurecimento da pele ocorrido durante a doença (Marzochi et al, 1981). William Boog Leishman no ano de 1900, em Bengal na Índia, identificou a presença de um protozoário no baço de um soldado que foi a óbito em decorrência da febre “Dum Dum” (Marzochi et al, 1981). Em 1903, o agente etiológico foi descrito por Donovan que demonstrou a presença dos parasitos em aspirados esplênicos de uma criança que apresentava febre irregular. Pesquisadores encontraram parasitos em cães no ano de 1908, na Tunísia, sugerindo o papel destes animais como reservatórios (Michalick et al, 2005). Apenas no ano de 1931 é que os flebotomíneos foram incriminados como vetores, onde a transmissão da doença ficou conhecida através de xenodiagnóstico em hamsters (Michalick et al, 2005). No Brasil em 1934, Henrique Penna relatou os primeiros casos da infecção no país a partir de lâminas histológicas de fígado examinadas post mortem para diagnóstico de febre amarela (Lainson et al., 1986; Genaro, 2000). Evandro Chagas estudando a epidemiologia da doença suspeitou que o mosquito responsável pela transmissão aos humanos fosse o flebotomíneo *Lutzomya longipalpis* devido sua constante presença ao redor e no interior das residências de pacientes doentes (Rangel et al, 2003). Em 1953, após um surto em humanos com LV no Ceará, pesquisadores realizaram uma investigação epidemiológica da doença e verificaram infecção natural em raposas (Rangel et al, 2003).

3.2. Agente etiológico e Transmissão

A *Leishmania* é um gênero de protozoários da família Trypanosomatidae, que inclui os parasitas causadores das leishmanioses. A Leishmaniose visceral,

calazar, é uma doença transmitida pelo “mosquito-palha” (*Lutzomyia longipalpis*) (Figura 1), que, ao picar, introduz na circulação do hospedeiro o protozoário *Leishmania chagasi* também denominado *Leishmania infantum* (Figura 1) (Campos, 2007). Os insetos desta família são pequenos e tem como características a coloração de cor palha e, em posição de repouso suas asas permanecem eretas e semi abertas. Por essas características são, conhecidos como mosquito palha (Vilela et al, 2013).



Figura 1- Mosquito palha. Fonte: (Michalick et al, 2005).

Esses protozoários são responsáveis por um amplo espectro de doenças tropicais e subtropicais do homem e de outros animais (Vilela et al, 2013). As principais formas encontradas durante o ciclo de vida (Figura 2) são a forma flagelada ou promastigota e forma aflagelada ou amastigota (Campos, 2007).

O ciclo biológico do vetor compreende uma fase larvária terrestre, em locais úmidos, sombreados e ricos em matéria orgânica. Do ovo à fase adulta decorrem cerca de 30 dias. As fêmeas são hematófagas obrigatórias, pois necessitam de sangue para o desenvolvimento dos ovos, tendo hábito alimentar noturno que se inicia cerca de 1 hora após o crepúsculo (Brasil, 2010).

A infecção do vetor ocorre pela ingestão, durante o repasto sangüíneo, de

formas amastigotas da *Leishmania* existentes no citoplasma de macrófagos presentes na derme do hospedeiro infectado. No tubo digestivo do inseto transformam-se em promastigotas que se multiplicam e, após 3 a 4 dias, as fêmeas tornam-se infectantes (Brasil, 2010). Durante novo repasto sangüíneo ocorre a inoculação das formas amastigotas que se multiplicam e disseminam por via hematogênica fechando o ciclo de transmissão (Murray, 2005).

A transmissão acontece quando uma fêmea infectada passa o protozoário a uma vítima sem a infecção, enquanto se alimenta de seu sangue (Vilela et al, 2013).

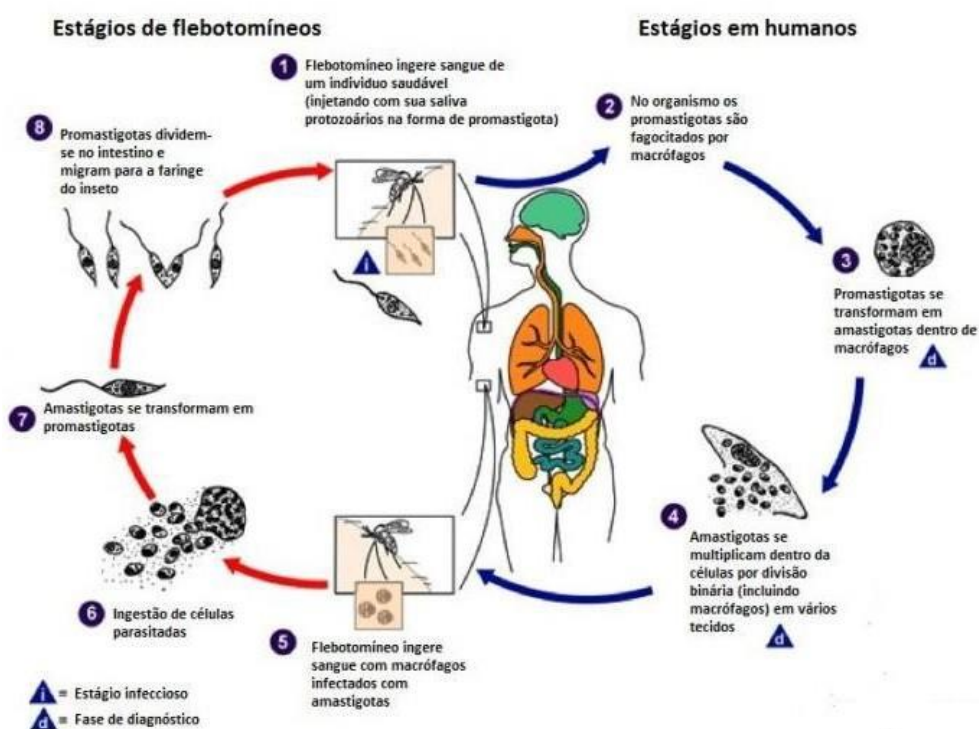


Figura 2- Ciclo do flebotomíneo. Forma amastigota e promastigota. Fonte: (Genaro et al, 2000).

2.3 EPIDEMIOLOGIA

A Leishmaniose é uma zoonose emergente com ampla distribuição em países de clima tropical e subtropical, atinge mais de 98 países em todo mundo. É considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS), uma das patologias que

mais causa impacto aos cofres públicos mundiais (Oliart-guzmán et al, 2013). É uma doença debilitante, que fica atrás apenas da Malária e Tuberculose. 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 (Oliveira et al, 2013). 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) (Gontijo et al, 2004). Como já citado, 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 (Brasil, 2014). Após passados 20 anos foi registrado o primeiro surto da doença em Sobral, no Ceará. Já em meados dos anos 80, constatou-se uma transformação drástica na distribuição geográfica da LV (Queiroz et al, 2004). 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 (Oliveira et al, 2013). Crianças têm uma susceptibilidade diante do sistema imunológico mais fragilizado e outros fatores como desnutrição que são comuns em áreas endêmicas (Gontijo et al, 2013). 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 (Brasil, 2014).

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, Três Lagoas, Campo Grande e Palmas (Queiroz et al, 2004).

Estudo realizado em Pernambuco por Alves et al 2016, mostrou que a taxa de incidência média de Leishmaniose Visceral no estado variou de 0,9 a 3,62 casos/100 mil habitantes e o ano de 2014 teve o maior número de casos. Os municípios da Região Metropolitana do Recife (capital do estado) tiveram uma taxa média (0,77) inferior aos demais (2,2). Predominaram o sexo masculino (61,3%), faixa etária até 14 anos (58,4%) e escolaridade até o ensino médio completo (72,9%). No início da série histórica, a maioria dos casos (66%) da doença residiam em zona rural e, nos últimos anos, em zona urbana. Identificou-se que 70% dos municípios pernambucanos tiveram pelo menos um caso da doença.

2.4 Sintomas

Alteração do estado geral, febre, palidez, fraqueza e aumento das vísceras - principalmente do baço, do fígado e da medula óssea. Nos cães também pode haver descamação de pele e crescimento progressivo das unhas (Gontijo, et al. 2004).

2.5 Métodos de diagnóstico e Tratamento

O diagnóstico da Leishmaniose no Sistema Único de Saúde baseia-se principalmente em exames imunológicos e parasitológicos.

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* (Loureiro et al, 1998).

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 (Ikeda- Garcia et al, 2007).

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 (Fio Cruz, 2009).

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 et al, 1999, a mesma não apresenta bons resultados para o diagnóstico da LVC. Ela tem sido usada, porém necessitando de estudos sobre possíveis reações cruzadas.

Diagnóstico parasitológico

Diagnóstico parasitológico: busca de formas amastigotas do parasito (Sampaio et al, 2002).

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 (Queiroz et al, 2010).

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 (Schubach, 2001).

No Brasil, os medicamentos utilizados para o tratamento de LV são o antimonial pentavalente e anfotericina B (Pelissari et al, 2011). 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 (Nogueira, 2009).

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..6 Biossensor

Biossensores são dispositivos que utilizam componentes biológicos como elementos de reconhecimento de outras moléculas biológicas, como vírus, bactérias, fungos ou mesmo células cancerígenas (Wang et al, 2014).

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 (Salgado et al, 2001). 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 (Souza et al, 2011).

Na Figura 3 pode-se observar o esquema de funcionamento de um biossensor, onde o analito é reconhecido pelo biorreceptor. Interação resultante é transformada num sinal elétrico pelo transdutor e registrado através do processamento de dados (Diaz-gonzalez et al, 2005)

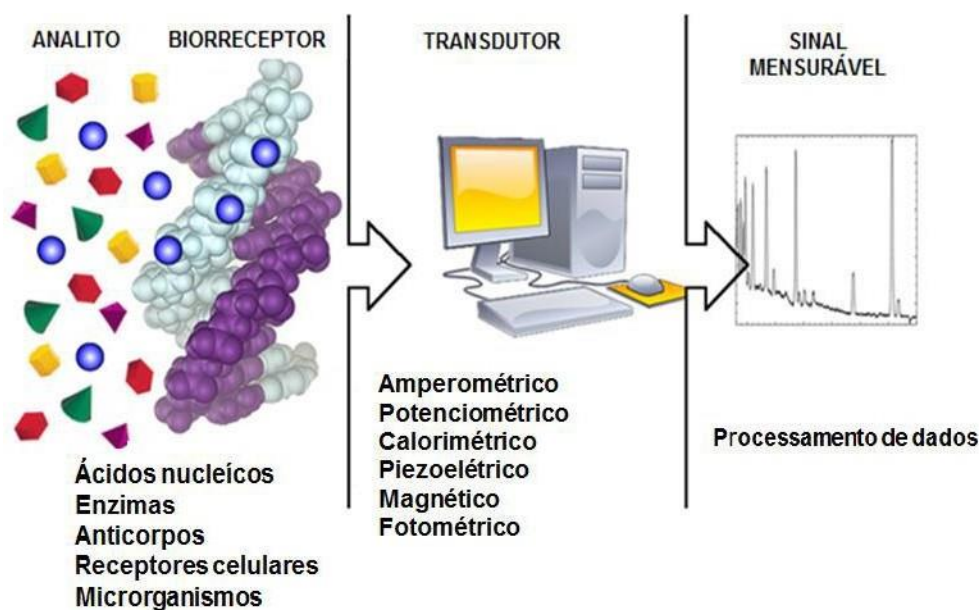


Figura 3- Esquema de Funcionamento de um Biossensor. Fonte: (Gontijo et al, 2004)

Nos últimos anos estudos (Wang et al, 2014, Souza et al 2011, Queiroz et al, 2010), comprovaram que o uso dos biossensores traz uma série de vantagens. 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.

2.6.1 Classificação dos Biossensores

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

2.6.2. 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 (Chambers et al, 2008).

Os **biossensores enzimáticos** fazem utilização de 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 dehidrogenase (Riccardi, 2002).

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 (Thevenot, 2001).

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 (Labuda, 2010).

Já os **genossensores** são biossensores eletroquímicos de DNA ou RNA, baseados na hibridação do ácido nucleico (Xing et al, 2014).

Os **aptassensores** são biossensores que utilizam aptâmeros como elemento de bioreconhecimento. Os aptâmeros são sequências de DNA ou RNA (Gaua et al, 2005).

2.6.3. Biossensores quanto ao sistema transdutor

Os biossensores podem ser classificados quanto ao sistema transdutor em eletroquímicos, condutimétricos, amperométricos,

potenciométricos, colorimétricos, piezoelétricos e ópticos (Figura 4) (Wang, 2005).

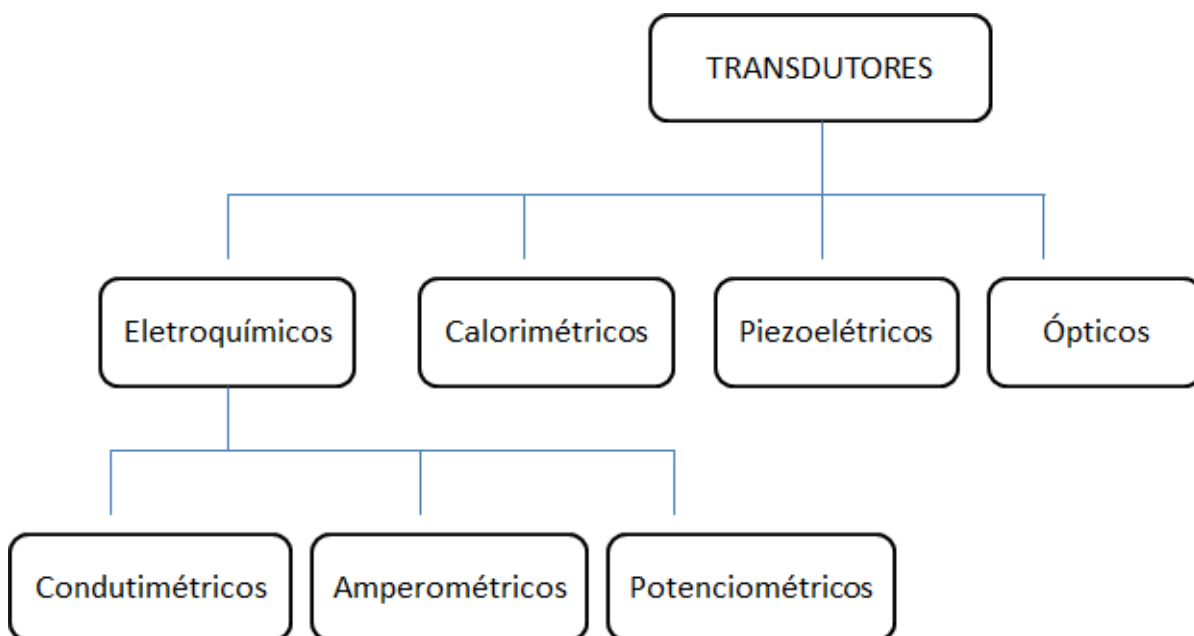


Figura 4- Classificação dos transdutores. Fonte: (Wang et al, 2014).

Os biossensores eletroquímicos são os biossensores mais comumente utilizados nos testes de monitoramento e diagnóstico em análises clínicas. Eles 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 (Gerard et al, 2002).

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 (Mehrvar, 2004).

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 (Mehrvar, 2004). 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 (Chambers et al, 2008).

Os potenciométricos baseiam-se na medição dos potenciais do eletrodo de trabalho em relação a um eletrodo de referência. Como exemplo, os eletrodos íons seletivos (Thevenot, 2001).

Os biossensores calorimétricos detectam substratos baseados no calor envolvido nas reações bioquímicas do analito com uma substância biológica ativa adequada, como uma enzima (Labuda, 2010). Não podem ser utilizados em sistemas que apresentem trocas de calor muito baixas. A perda do calor diminui a sensibilidade dos biossensores calorimétricos. Além dos biossensores já citados destacam-se também os piezoelétricos e os ópticos (Wang, 2005).

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 (Gerard et al, 2002).

Os ópticos são baseados no princípio de transdução como a absorbância, 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 (Xing et al, 2014).

2..7 Genossensores

2.7.1. Uso e aplicações

Ácidos Nucleicos-

Os ácidos nucleicos são as biomoléculas mais importantes no que diz respeito ao controle celular e informação genética, compondo e armazenando os processos de transmissão do DNA e RNA. Um ácido nucleico é formado por moléculas gigantes (chamadas macromoléculas) que, por sua vez, são formadas por

nucleotídeos (unidades monoméricas) compostos por açúcar (pentose), um radical fosfato e uma base orgânica nitrogenada (Marques et al, 2008)

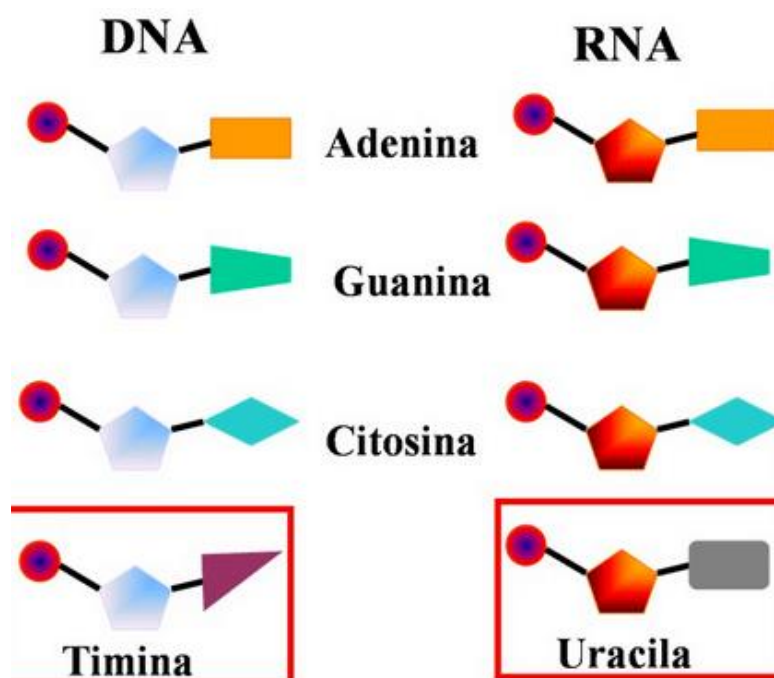


Figura 5- Estrutura dos ácidos nucleicos. Fonte: (Marques et al, 2008).

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.

Os biossensores baseados na hibridização de ácido nucleico tem recebido uma considerável atenção devido a sua potencial aplicação para o

diagnóstico de várias doenças (Zhang et al, 2006). A resposta eletroquímica sensível é baseada na oxidação direta de ácidos nucleicos, ou indiretamente pela reação redox de moléculas indicadoras de hibridização, como indicadores químicos. A utilização de biossensores de ácidos nucleico pode ser vista em pesquisas envolvidas na detecção de doenças como: Tuberculose (Zhang et al, 2006); Papilomavirus Bovino (Wang, 2005); Dengue (Costa et al, 2014); Leishmaniose (Souza et al, 2011).

A versatilidade das técnicas eletroquímicas propiciou não apenas a análise estrutural dos ácidos nucleicos, como também sua determinação em baixos níveis

de concentração (Costa et al, 2014). 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 (Nascimento et al, 2012).

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). Existem vários métodos de imobilização sobre a superfície transdutora, tais com adsorção, encapsulação, ligação covalente e ligação covalente cruzada. Para imobilização sobre da sonda pode-se utilizar adsorção física ou ligação covalente (Nascimento et al, 2011) (Figura 5). Nos trabalhos desenvolvidos 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 (Marques et al, 2008). 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 (Karamollaoglu et al, 2008).

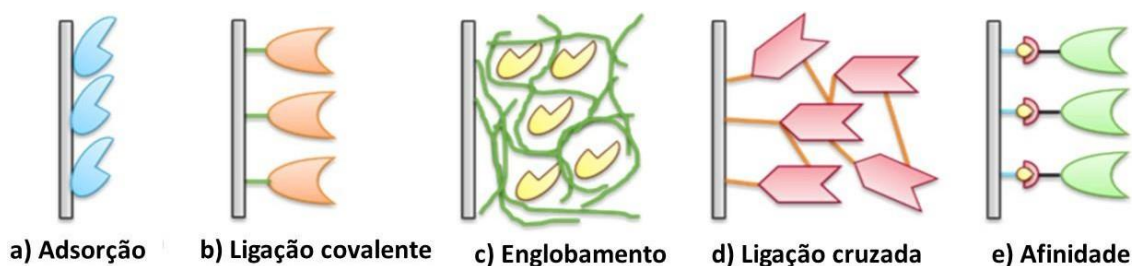


Figura 6- Esquema ilustrativo dos quatro tipos básicos de métodos de imobilização: a) adsorção, b) ligação covalente c) encapsulação, d) ligação covalente cruzada e (e) afinidade. Fonte: (Adaptado de Dominguez-Benetton et al., 2013).

2.8. Modificações de superfícies sensoras

2.8.1. Nanopartículas

A nanotecnologia inclui a ciência de materiais para o domínio de partículas e interfaces com dimensões extremamente pequenas. As nanopartículas foram detectados na década de 1980, com um microscópio eletrônico (Quina et al, 2004). 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 (Abdi, 2010). O aproveitamento dessas propriedades em aplicações tecnológicas forma a base da nanotecnologia de materiais (**Figura 6**) (Quinta et al, 2004).

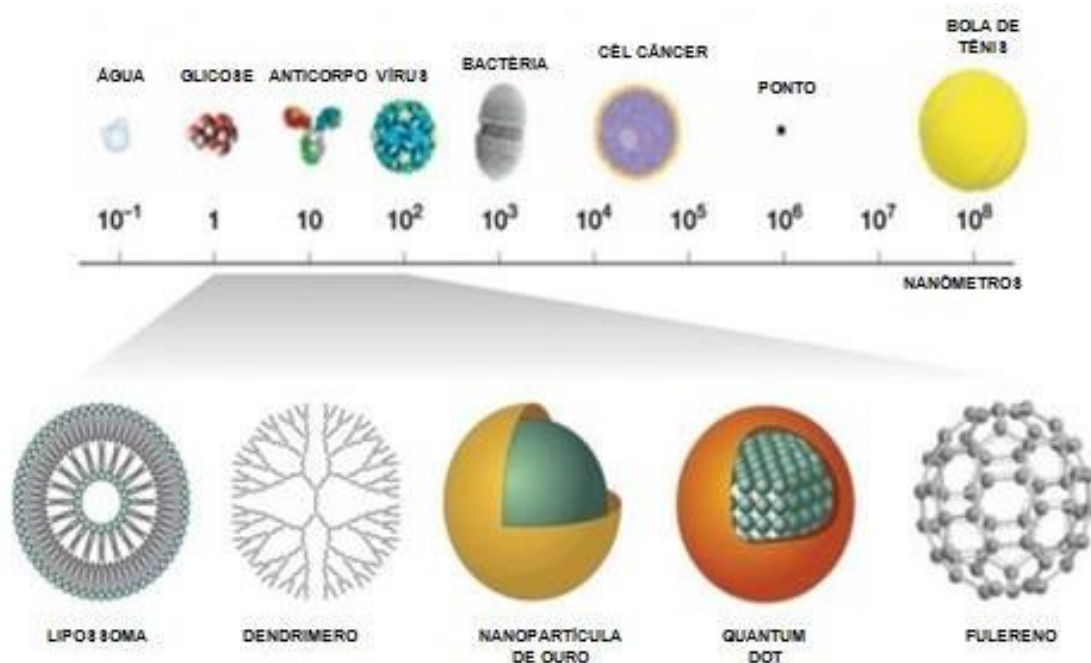


Figura 7- Comparação do tamanho de nanopartículas. Fonte: (Michalick et al, 2005).

A junção da nanoengenharia com a biologia permite a manipulação dos sistemas vivos e/ou construção de materiais biologicamente inspirados a nível molecular sendo, atualmente, um dos grandes desafios no desenvolvimento de biossensores (Michalick et al, 2005).

Há vários anos, laboratórios ao redor do mundo desenvolvem pesquisas na direção da miniaturização, sobretudo de sistemas eletrônicos, nanopartículas, sistemas nanoparticulados (Oliveira, 2008). 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 (Campos, 2007).

A modificação da superfície do eletrodo, com compósitos tem levado ao desenvolvimento de vários sensores eletroquímicos.

2.8.2. Polianilina e Quitosana: aplicações no desenvolvimento de biossensores

Atualmente os materiais poliméricos são utilizados em grande escala, em diversos setores da economia mundial (Sargentelli et al, 2010). 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 (Medley, 2008). 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 (Vidotti et al, 2011). 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 (Oliveira et al, 2011) (Melo, 2009).

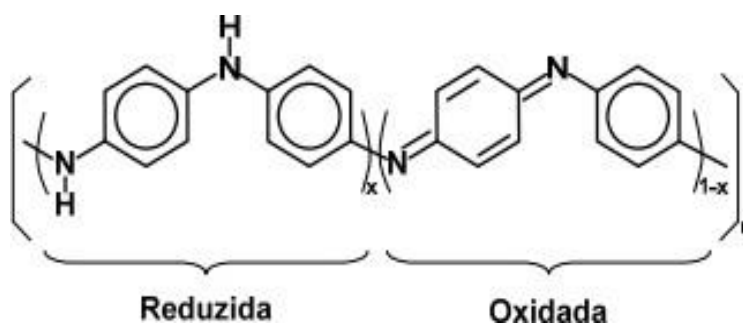


Figura 8- Estrutura geral da Polianilina (PAN), mostrando as unidades reduzidas (ganha elétrons) e oxidadas (perde elétrons). Fonte: (Carvalho et al, 2006).

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 (Santana, 2012). A polianilina pode ocorrer em diferentes estados de oxidação, dos quais a

forma esmeraldina, 50% oxidada, é a mais estável (Akira, 2005). A forma base esmeraldina (isolante) do polímero pode reagir com ácidos (HCl) resultando na forma sal esmeraldina (condutora) (Vicentini, 2013). A reação de protonação ocorre principalmente nos nitrogênios imínicos da polianilina ($-N=$). Este estado contém duas unidades repetitivas, a amina-fenileno e a iminaquinona (Carvalho, 2006). 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 8) (Pacheco et al, 2013).

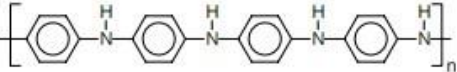
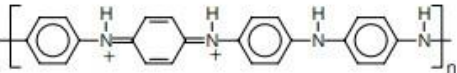
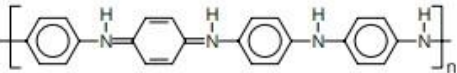
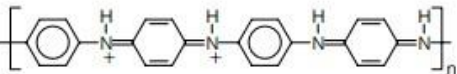
Estado de oxidação	Estrutura	Cor*	Característica
Leucoesmeraldina		amarela 310	isolante completamente reduzida
Sal de esmeraldina		verde 320, 420, 800	condutora parcialmente oxidada
Base esmeraldina		azul 320, 620	isolante parcialmente oxidada
Pernigranilina		púrpura 320, 530	isolante completamente oxidada

Figura 9- Os três estados de oxidação mais importantes da polianilina: leucoesmeraldina, esmeraldina. Fonte: (Melo et al, 2009).

A quitosana é considerada um suporte ideal para imobilização de biomoléculas, sejam elas proteínas, enzimas, polinucleotídeos, etc devido ao grande percentual de grupos amino e hidroxila disponíveis em sua estrutura química. Possui facilidade para formação de gel, é hidrofílica, biodegradável, biocompatível e antibactericida (Brett et al, 1993). Além disso, é economicamente viável, e bastante empregada na medicina, em produtos farmacêuticos, na agricultura, em biotecnologia, na indústria de cosméticos e de alimentos e, também, como adsorvente na remoção de corantes e no tratamento de efluentes industriais (Carmo et al, 2014) (Oliveira, 2006).

Desta forma, a polianilina é um polímero condutor comercialmente

atraente devido a sua facilidade de síntese, boa estabilidade, fácil controle da condutividade e baixo custo de produção em larga escala. Entretanto, a polianilina não forma filmes finos com boas propriedades mecânicas e seu uso se torna limitado. Uma das formas de melhorar a processabilidade e as propriedades mecânicas da polianilina é a preparação de blendas e compósitos.

A quitosana é um biopolímero natural obtido a partir da desacetilação da quitina, encontrada no exoesqueleto de crustáceos. A mistura desses dois polímeros resulta na formação de uma blenda polimérica com finalidade de se obter materiais com características físicas e físico-químicas diferenciadas, combinadas de modo a conservar as vantagens de cada polímero.

A quitosana, quimicamente modificada, tem sido empregada tanto na forma de microesferas, quanto na de filmes, ou de pó, ou de membranas, como adsorvente galactose oxidase, glutamato oxidase, glicose oxidase, peroxidase, lactato oxidase, sulfito oxidase) e na construção de biossensores (Figura 9) (Santos, 2012).

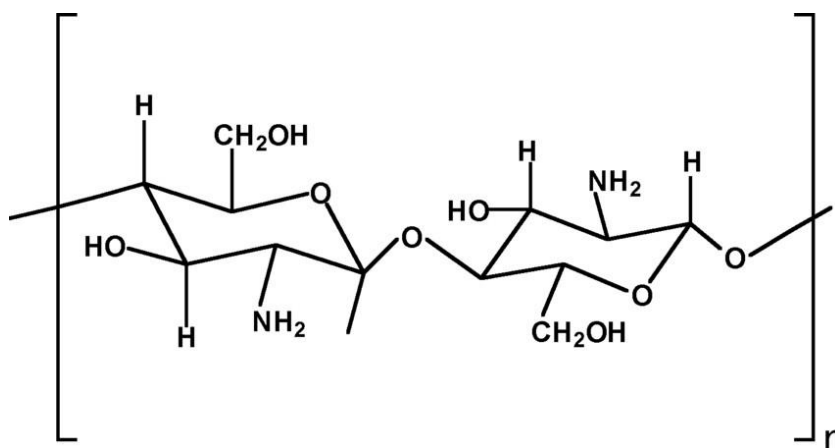


Figura 10- Estrutura Química da Quitosana. Fonte: (Oliveira, 2006).

2.8.3 Nanopartículas de óxido de ferro e biossensores

O surgimento da nanotecnologia trouxe várias oportunidades para melhorar a sensibilidade, estabilidade e interferências das plataformas biossensoras. As nanopartículas despertam muito interesse diante de suas

várias propriedades: alta eficiência catalítica, boa capacidade de adsorção, formação de filme entre outras propriedades (Devi et al, 2014).

Nanopartículas magnéticas (NPMs) são materiais nanoestruturados entre 1 e 100 nm de diâmetro que direcionam sua movimentação na presença de campo magnético. De maneira geral, a composição básica de uma NPM é um metal (M) diretamente ligado a um óxido de ferro, que pode ser exemplificado como MFe_2O_4 . Assim, os sistemas magnéticos nanoparticulados podem ser dispostos em duas classes: as nanopartículas constituídas de metais de transição (Mn, Co, Ti) e as nanopartículas de óxidos metálicos (FeO , Fe_2O_3 , NiO , FeO). Dentre os óxidos metálicos nanoparticulados, a magnetita, de estrutura molecular Fe_3O_4 , pode ser considerado seu principal representante e objeto central desse trabalho. Isto acontece porque esse material apresenta uma série de características que o tornam base para a construção de sistemas mais complexos e com aplicações nas mais diferentes vertentes tecnológicas.

As nanopartículas magnéticas vêm ganhando destaque nas aplicações biológicas, como a aplicação de diferentes formas de óxido de ferro, o óxido de ferro (II) FeO ; óxido férrico (III) Fe_2O_3 e óxido de ferro (II, III) Fe_3O_4) para procedimentos diagnósticos como ressonância magnética nuclear (RMN), carreador magnético de drogas, catálise e liberação controlada de drogas e tratamento de câncer por hipertermia magnética (Nogueira et al, 2009).

As aplicações terapêuticas exploram as duas maiores vantagens dos óxidos de ferro: sua baixa toxicidade em seres humanos e a possibilidade de se controlar sua magnetização (Oliveira et al, 2008).

As nanopartículas magnéticas, como as nanopartículas de Fe_3O_4 , têm sido amplamente utilizadas na coleta e separação de moléculas bioativas, na liberação direcionada de fármacos e em aplicações biomédicas. As muitas técnicas de imobilização de biomoléculas na superfície de nanopartículas magnéticas permitiram a produção de bioconjugados com propriedades magnéticas e estas substâncias são úteis para a entrega e recuperação de biomoléculas em aplicações biomédicas (Liu et al., 2015).

Por causa de suas dimensões submicrométricas e propriedades químicas e físicas especiais, as nanopartículas de Fe_3O_4 foram aplicadas na construção de biossensores baseados em DNA, proteínas e enzimas com melhores limites de detecção, sensibilidade e tempos de resposta reduzidos. Uma propriedade muito importante deste tipo de nanopartículas para biossensores eletroquímicos é sua capacidade de fornecer um microambiente favorável para biomoléculas, como proteínas, para trocar elétrons diretamente com um eletrodo, melhorando assim a sensibilidade dos biossensores eletroquímicos (Figura 10) (Wu et al., 2015, Cheng et al., 2011).

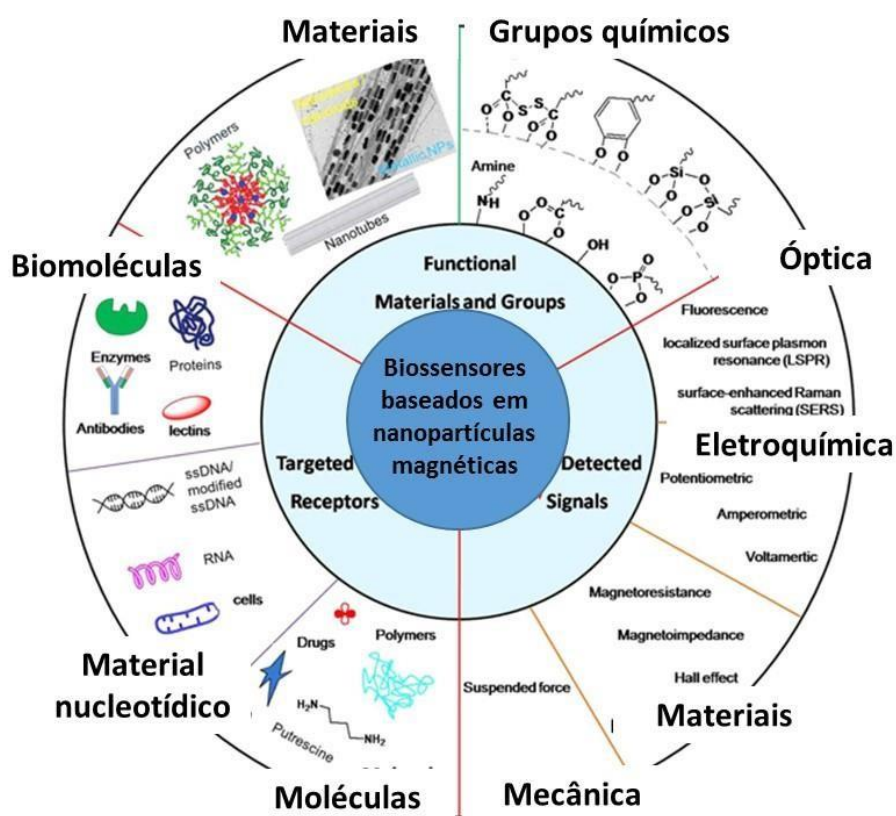


Figura 11: Visão geral das aplicações das nanopartículas magnéticas. Fonte: (Adaptado de Wu et al, 2015).

As nanopartículas magnéticas têm despertado grande interesse na área biotecnológica porque seu tamanho médio é menor ou comparável com o de vírus (20 a 450 nm), proteínas (5 a 50 nm) e genes (2 nm de largura e de 10 a 100 nm de comprimento). Além disso, a capacidade de serem

manipuladas por um gradiente de campo magnético externo para transporte e imobilização in vivo de modo não- invasivo as tornam candidatas promissoras para muitos estudos. Para atribuir uma variedade grande de aplicações às NPMs, elas geralmente são funcionalizadas, contendo basicamente um núcleo magnético envolvido por uma camada polimérica que pode conter sítios ativos ancorando compostos orgânicos seletivos ou metais (Tang et al., 2012).

A aplicação de nanopartículas magnéticas em biossensores tem as seguintes vantagens: (i) possibilidade de regeneração não-química do biossensor usando um campo magnético externo; (ii) Relação superfície-volume extremamente alta e biocompatibilidade, resultando em aumento da sensibilidade e (iii) Previne a agregação de moléculas quando as nanopartículas magnéticas são usadas diretamente como marcadores.

2.8.4.Nanopartículas de óxido de zinco (ZnONPs)

A empregabilidade do óxido de zinco é crescente por possuir estabilidade química exibindo um grau significativo de seletividade a substâncias tóxicas (Patel et al., 2016), possuem uma notoriedade devido as estabilidades físicas e químicas, alta capacidade oxidativa e largura de banda proibida na região UV ou visível no espectro eletromagnético, baixo custo, alta disponibilidade e baixa toxicidade (Seongpil et al., 2014), além da biocompatibilidade expressiva, induzindo respostas específicas em detrimento do seu uso (Aude-garcía et al., 2016).

O óxido de zinco (ZnO) é um tipo de semicondutor (3,37 eV), com propriedades elétricas significativas (60 meV) (Nai-feng et al., 2014). Além disso, atesta estabilidade em longo prazo, alta sensibilidade e confere provável aumento do sinal eletroquímico (Salih et al., 2016) garantindo sua aplicação em biossensores.

Os óxidos de metais nanoestruturados vêm chamando muita atenção devido às suas interessantes propriedades de superfícies dependentes de: tamanho eletro- analítico, piezoelétrico, fotônico que tornam atraente para

aplicações de biossensores. Neste contexto óxido de zinco têm sido utilizados para imobilização de proteínas, enzimas e antígenos para transferência acelerada de elétrons entre biomoléculas e eletrodos imobilizados desejados.

Esses destacam por ser nanomateriais com propriedades de grande interesse pelo fato de possuir grande relação superfície-volume, alta atividade de reação superficial, alta eficiência catalítica e forte capacidade de adsorção que os tornam potenciais candidatos a desempenhar um papel catalítico na fabricação de imunossensores (Aness et al., 2009).

Dentre alguns sensores de óxido de zinco podemos destacar o uso de ZnONPs para detecção de antígeno do câncer ovariano (Gasparotto et al., 2017), para imunodeteção de cortisol (Vabina et al., 2015) avaliação dos níveis de dopamina (Foodazas et al., 2012). Em adição, a literatura também demonstra o uso de ZnONPs no desenvolvimento de aptasensores, como por exemplo aptasensor para trombina uma importante proteína a envolvida nos processos de coagulação sanguínea (Evtugyn et al., 2013).

2.8.5. Eletropolimerização como estratégia para construção de biossensores

A eletropolimerização vem sendo muito utilizada como uma nova estratégia para imobilização do filme na superfície do eletrodo de ouro (Costa et al, 2014). Uma das principais vantagens da eletropolimerização reside no fato de que, há um maior controle dos parâmetros de produção do polímero, sendo possível controlar precisamente a espessura dos filmes depositados. Nesse processo, o polímero é oxidado devido a um potencial aplicado na célula eletroquímica, sendo que os contra-íons são incorporados (dopagem) para neutralizar a carga (Oliveira et al, 2008).

Os processos de eletropolimerização se iniciam em potenciais anódicos, promovendo oxidação do monômero próxima a interface eletrodo/solução. Os monômeros oxidados (cátions radicais) podem sofrer acoplamento com outros monômeros oxidados, ou neutros, formando dímeros, trímeros até oligômeros, que se depositam na superfície do

eletrodo (Figura 12) (Santos et al, 2016).

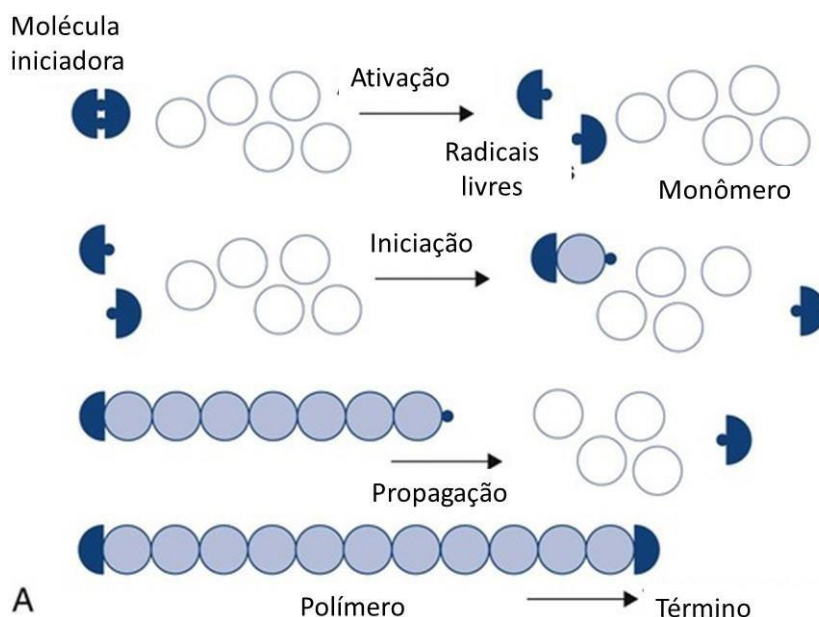


Figura 12: Processo de eletropolimerização. Fonte: Santos et al, 2016

Os polímeros mais utilizados como matrizes em biossensores são os condutores, tais como polianilina, polipirrol e seus derivados. Estes polímeros podem ser usados em biossensores eletroquímicos e possibilitam o desenvolvimento de novos materiais com maior sensibilidade e seletividade.

Destaca-se que apesar de serem isolantes, os polímeros, que são conjugados, podem apresentar valores de condutividade acima de 1000 S. cm⁻¹ após um processo de dopagem química ou eletroquímica. A estrutura dos polímeros se caracteriza por uma alternância de ligações saturadas e insaturadas, fazendo com que os elétrons π sejam deslocalizados ao longo da cadeia polimérica principal.

No presente trabalho foi realizado eletropolimerização utilizando NPs Fe₃O₄, quitosana e polianilina, onde através de um potencial aplicado houve o processo de eletrodeposição na superfície do eletrodo.

2.9. MÉTODOS ELETROQUÍMICOS

2.9.1. Voltametria Cíclica

A voltametria cíclica é a técnica comumente usada para adquirir informações qualitativas sobre os processos eletroquímicos (Costa et al, 2014). 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 adsortivos (Garcia et al, 2015).

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 (Shi et al, 2014). 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 (Silva et al, 2010). 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 obtida como um sinal de resposta (Stevanato et al, 2014).

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 (Singh et al, 2008) (Song et al, 2006). 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

(Souza et al, 2008). A forma de aplicação do potencial na voltametria cíclica é representada na, o potencial é varrido linearmente com o tempo no eletrodo de trabalho estacionário (Figura 11) (Suarez et al, 2013).

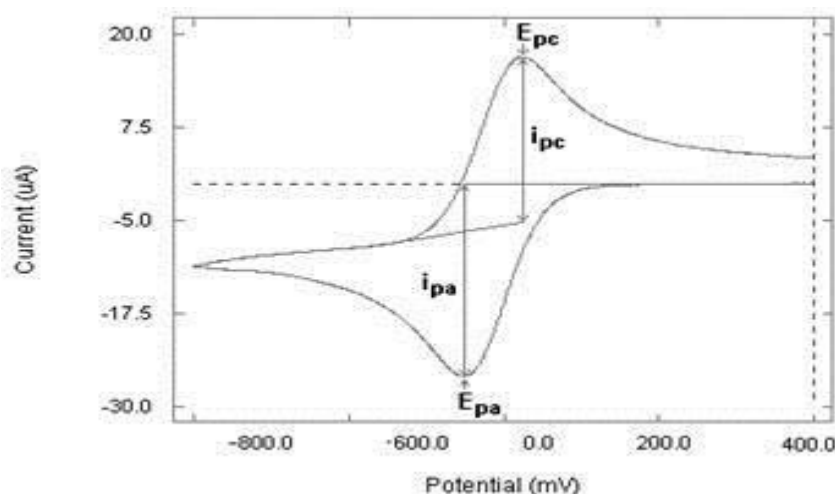


Figura 13- Voltamograma Cíclico. Fonte: (Oliveira et al, 2008)

2.9.2. Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

A espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) é um método de análise que atua na caracterização da impedância de um sistema sensível a fenômenos de superfície como também de alterações das propriedades dielétricas do meio (Skoog et al, 2002). Devido a estes fatores a EIE é uma técnica relevante na área dos biossensores e importante como método de detecção da ligação entre o elemento de reconhecimento do sensor e o analito (Garcia et al, 2015). A técnica de EIE oferece diversas vantagens tais como baixo custo, rapidez e facilidade de instrumentação. A EIE vem sendo empregada em genossensores, devido ao melhoramento da transferência de elétrons que ocorre durante o processo de hibridização do DNA (Tan et al, 2005).

Trata-se de uma técnica de caracterização elétrica, que fornece um aspecto completo e detalhado das características elétricas da interface eletrodo/solução (Costa et al, 2014). Envolve a aplicação de uma perturbação de potencial ou de corrente no sistema sob investigação (Stathard et al, 2014). 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 (Oliveira et al, 2008).

Além disto, é possível perturbar o sistema usando diferentes valores de frequência, pois a onda de potencial é senoidal (Tan et al, 2005). 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. Numa mesma medida, podem ser determinadas a resistência de polarização e a capacitância da dupla camada (Souza et al, 2008).

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 (Song et al, 2006).

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) (Garcia et al, 2015).

$$R= U/I$$

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 (Singh et al, 2008).

O circuito da (Figura 12) é conhecido como circuito de Randles (Costa et al, 2014). 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 (Wang et al, 2003). A região de alta frequência está associada com a resistência da solução eletrolítica, R_e . A região de frequências 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} (Wang et al, 2012).

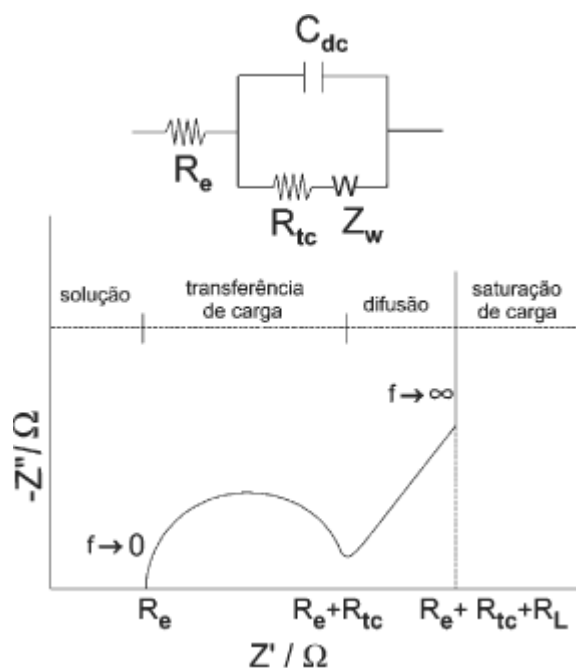


Figura 14- Circuito do tipo Randles (no topo) e sua resposta idealizada no plano de impedância complexa. Fonte: (Costa et al, 2014).

Em baixas frequências a impedância é caracterizada por processos de transporte de massa por difusão (Wang et al, 2003) (Nascimento et al,

2012). 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, ZW, e uma segunda região linear ainda em baixas frequências 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 (Zhang et al, 2006).

2.10. ANÁLISE MORFOLÓGICA

2.10.1 Microscopia de Força Atômica

A invenção da microscopia de força atômica (AFM) foi o primeiro exemplo de método de análise micrométrica e tornou possível o emprego do cantilever em aplicações topográficas com alta resolução a dimensões reduzidas e não- topográficas (sensores com mecanismo de transdução mecânica) (Ferreira et al, 2006). Na obtenção de imagens topográficas, é empregada uma sonda constituída de uma fina ponteira ("tip") acoplada a um cantilever, para fazer o rastreamento da superfície da amostra (Santos, 2016). A deflexão do cantilever é a resposta das forças de interações atômicas entre a ponteira e o substrato (Wang et al, 2012). Com o método de análise micromecânica a partir da AFM, foram desenvolvidos sensores para estudar as forças envolvidas nas interações moleculares, tendo como transdutor o cantilever. As forças de interações entre moléculas da superfície da amostra com moléculas imobilizadas na ponteira resultam na deflexão do cantilever, o qual atua como um transdutor de força (Figura 13) (Wang et al, 2008).

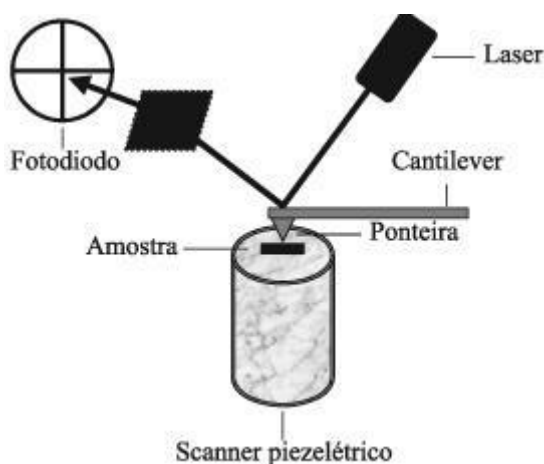


Figura 15- Microscopia do força atômica. Fonte: (Ferreira et al, 2000)

O princípio de funcionamento do AFM baseia-se na varredura da superfície da amostra por uma ponta piramidal (ponteira) de alguns micrômetros de comprimento (100 a 200 μm) e geralmente com menos de vinte nanômetros de diâmetro, integrada em um cantilever flexível (Oliveira et al, 2008). A sonda (ponteira + cantilever) é sempre o componente básico do SPM e, para alcançar resolução atômica, a ponta tem que terminar em um conjunto de átomos. A força entre a ponta e a superfície da amostra faz com que o cantilever se aproxime ou se afaste e essa deflexão é proporcional à força de interação (Zhang et al, 2006). Na parte superior da haste há um espelho que reflete a luz de um feixe de laser. Após a reflexão, o feixe de laser passa por uma lente e incide sobre um fotodetector (fotodiodo) de quatro quadrantes, que mede as variações de posição e de intensidade da luz produzidas pelas deflexões do cantilever (Mohan et al, 2011). À medida que a ponta varre a amostra ou a amostra é deslocada sob a ponta, os diferentes tipos de "acidentes geográficos" encontrados sobre a superfície fazem com que a interação mude (Doleman, 2007). As variações das interações são os fatores que provocam diferentes deflexões. Essas diferenças, captadas no detector, são armazenadas e processadas por um computador, que as transformam em imagens topográficas da superfície bi e tridimensionais. A força mais comumente associada com AFM na deflexão do cantilever é a força de van der Waals (Ferreira et al, 2006).

A técnica de AFM, conforme apresentado na Figura 14, pode ser operada em três modos diferentes: contato, não-contato e contato intermitente.

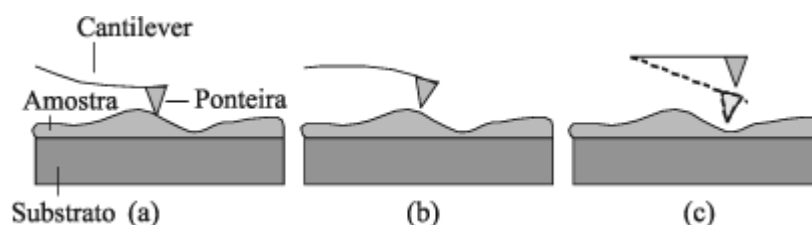


Figura 16- Representação esquemática dos modos de operação em AFM: (a) modo contato, (b) modo não- contato e (c) modo intermitente. Fonte: (Ferreira, 2006)

No modo contato, o cantilever é mantido a poucos ângstrons da superfície da amostra e a força interatômica entre a ponta e a amostra é repulsiva (Oliveira et al, 2008). Neste modo de operação, a ponta faz um leve "contato físico" com a amostra produzindo imagens com alta resolução, mas a compressão e as forças geradas, entre a ponta e a superfície, podem causar danos à amostra, o que é especialmente prejudicial às amostras biológicas que são sensíveis e nem sempre fortemente aderidas ao substrato (Ferreira et al, 2006).

No modo de não-contato, o cantilever é mantido de dezenas a centenas de ângstrons da superfície da amostra e a força interatômica entre a ponta e a amostra é atrativa (Mohan et al, 2011). Neste caso a ponta oscila em alta frequência (100 kHz a 1 MHz), a poucos nanômetros acima da superfície e a força total entre a ponta e a amostra é muito baixa, geralmente em torno de 10^{-12} N (Castro et al, 2017). Esta oscilação aumenta consideravelmente a sensibilidade do microscópio, o que faz com que forças de van der Waals e forças eletrostáticas possam ser detectadas (Drummond, 2007). O modo de não-contato não sofre os efeitos do atrito sobre a amostra, causada pela ponta, conforme é observado no modo contato após

diversas varreduras (Gonçalves et al, 2017). Por outro lado, este modo não tem encontrado aplicabilidade geral, devido à instabilidade entre a ponta e as forças adesivas da superfície e à resolução reduzida pela distância ponta-amostra que é relativamente grande. Esta limitação tem sido contornada com a utilização do modo intermitente (Ferreira et al, 2006).

No modo contato, o cantilever é mantido a poucos ângstrons da superfície da amostra e a força interatômica entre a ponta e a amostra é repulsiva (Oliveira et al, 2008). Neste modo de operação, a ponta faz um leve "contato físico" com a amostra produzindo imagens com alta resolução, mas a compressão e as forças geradas, entre a ponta e a superfície, podem causar danos à amostra, o que é especialmente prejudicial às amostras biológicas que são sensíveis e nem sempre fortemente aderidas ao substrato (Ferreira et al, 2006).

No modo de não-contato, o cantilever é mantido de dezenas a centenas de ângstrons da superfície da amostra e a força interatômica entre a ponta e a amostra é atrativa (Mohan et al, 2011). Neste caso a ponta oscila em alta frequência (100 kHz a 1 MHz), a poucos nanômetros acima da superfície e a força total entre a ponta e a amostra é muito baixa, geralmente em torno de 10^{-12} N (Castro et al, 2017). Esta oscilação aumenta consideravelmente a sensibilidade do microscópio, o que faz com que forças de van der Waals e forças eletrostáticas possam ser detectadas (Drummond, 2007). O modo de não-contato não sofre os efeitos do atrito sobre a amostra, causada pela ponta, conforme é observado no modo contato após diversas varreduras (Gonçalves et al, 2017). Por outro lado, este modo não tem encontrado aplicabilidade geral, devido à instabilidade entre a ponta e as forças adesivas da superfície e à resolução reduzida pela distância ponta-amostra que é relativamente grande. Esta limitação tem sido contornada com a utilização do modo intermitente (Ferreira et al, 2006).

O modo contato intermitente é similar ao não-contato, exceto pelo fato de que a ponta vibrante fica mais próxima da amostra, de forma que tenha um contato intermitente e é utilizado para contornar as limitações impostas

pelo modo contato (Meloni et al, 2017). A comparação das imagens nos modos contato e intermitente mostra que as superfícies são menos modificadas no modo intermitente (Xui, 2007).

A utilização de Microscopia de força atômica no desenvolvimento de sistemas nanoestruturados, vem se tornando cada vez mais frequente, devido a boa capacidade de caracterização de filmes automontados (Carneiro et al, 2017) (Santos, 2016).

3.0 METODOLOGIA

3.1 Materiais

Amostras sanguíneas de cães foram coletadas e armazenadas com anticoagulante citrato. Os reagentes eram de grau analítico e usados tal como recebidos. Ferri- ferrocianeto de potássio foram obtidos a partir VETEC (Brasil). Água ultrapura foi obtido a partir de um Milli-Q Plus (Billerica, EUA) Sistema de purificação. As Nps Fe_3O_4 e Nps $\text{ZNO}_3 \text{NH}_3$ foram sintetizadas no Laboratório de Biodispositivos Nanoestruturados-UFPE, Recife-PE.

3.2. Equipamentos

As medidas eletroquímicas foram realizadas num Potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT128N numa célula convencional de três eletrodos, eletrodo de trabalho, eletrodo de ouro como contra eletrodo e eletrodo de referência Ag/ AgCl (KCl saturado) usados durante todo o trabalho (Figura 15). As imagens de microscopia de força atômica foram obtidas a partir de um (SPM-9700, Shimadzu Corporation, Japan).



Figura 17- Potenciostato e Célula eletroquímica convecional de três eletrodos: trabalho, referência e contra-eletrodo. Fonte: (Garcia et al, 2015).

3.3. Síntese e preparação Nps Fe₃O₄

As nanopartículas foram obtidas através do método de co-precipitação. Cerca de 200 mL da solução de FeCl₃ 0,1 M • 6H₂O e 0,5 M de solução aquosa de FeSO₄ • 7H₂O foram colocadas num balão de fundo redondo e mantidas sob agitação intensa, numa atmosfera isenta de oxigênio durante 30 min, até atingir o pH de 1,7 (Pundir et al, 2014). Posteriormente 500µL de hidróxido de amônio foram adicionados gota a gota. A mistura então foi agitada a 60 ° C durante 6 horas sob atmosfera de N₂. As NPsFe₃O₄ não revestidas foram eliminadas por meio de lavagem com 0,1 M HCl (Santos et al, 2017).

3.4. Síntese Nps ZnO₃ NH₃

O APTES em condição ácida ou básica foi preparado no seguinte processo: 1,5 g de óxido de zinco, disperso em água destilada (50ml- pH 6,8-7,2), o o pH inicial foi ajustado para 6,5 com HNO₃. A solução foi agitada durante 1hora e mais 1 ml de APTES foi adicionado. Após adição do APTES o pH chegou 9,7 por conta da propriedade básica dos grupamentos amino, e após alguns minutos estabilizou em 8,9-9,2. A solução ficou sob agitação por 24h horas, o excesso do APTES foi removido por filtração e lavagem com álcool e acetona. O pó foi seco a 60°C sob vácuo (Grasset et al, 2003).

3.5. Preparação do sistema NpsFe₃O₄/Quit/PANI-Primer^{Leishmania}

Para montar o nanocompósito juntou-se 0,001ng de nanopartículas de magnetita (Fe₃O₄) e 1 mL de quitosana colocadas sob sonicação por 30min, em seguida adicionado 10mL de HCL (0,5M) e 180µL de anilina.

O procedimento seguido para preparar o biossensor foi o seguinte: O eletrodo foi polido com uma lixa com água deionizada, seguido por imersão em solução de hipoclorito de sódio durante aproximadamente 10 minutos e secou-se à temperatura ambiente. Após lavagem com água deionizada o

eletrodo foi imediatamente imerso na solução de eletrodeposição magnetita/quitosana/polianilina (10mL) onde foram realizados 30 ciclos, a fim de obter o filme de magnetita/ quitosana/ polianilina. Seguida a lavagem foi adicionado o Primer e incubado durante 30 minutos para se obter o sistema NpsFe₃O₄/Quit/PANI-Primer, posteriormente a incubação do genoma foi realizada por um período de tempo 30 minutos e, finalmente, a amostra com o DNA-alvo pelo mesmo período. A lavagem foi executada com água deionizada após cada incubação.

3.6. Preparação do sistema AMP-ZnNH₃-Primer_{Leishmania}

Eletrodo de ouro foi polido com alumina 0,5µm e submetido a ultrassonicação 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 AMP por 60 min (4µl), após isso modificou-se a superfície com EDC NHS por 15 min e ZnNH₃ por 20 min. Concluídas essas etapas o sistema sensor foi submetido a amostra de Primer_{Leishmania}. Após obtenção do eletrodo modificado AMP-ZnNH₃-Primer_{Leishmania} este sistema foi submetido a incubação com o genoma de pacientes contaminados com genoma de *L. infantum* (30min) diluídos em tampão fosfato de sódio (TFS) pH 7,4 (Siddiquee et al, 2014).

3.7. Análise dos sistemas NpsFe₃O₄/Quit/PANI-Primer_{Leishmania} e MPA- ZnNH₃-Primer_{Leishmania} frente ao material coletado de cães contaminados.

Após obtenção do eletrodo modificado com NpsFe₃O₄/Quit/PANI-Primer_{Leishmania} e MPA-ZnNH₃-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. Os experimentos de hibridização foram realizados por gotejamento no eletrodo modificado com NpsFe₃O₄/Quit/PANI-Primer_{Leishmania} e MPA-

ZnO-NH₃-Primer_{Leishmania} 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 (Pundir et al, 2014).

3.8. 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. Todas as medidas eletroquímicas foram realizadas em temperatura ambiente e dentro de uma gaiola de Faraday (Costa, 2014) (Oliveira, 2008) (Santos, 2016).

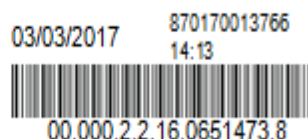
3.9. Caracterização morfológica- Microscopia de força atômica

As análises morfológicas foram realizadas em um microscópio de força atômica (SPM-9700, Shimadzu Corporation, Japan) no método não contato, a temperatura ambiente, (aproximadamente 25°C). Cantilevers de silicone coma sonda (frequência de ressonância = 300 kHz, energia constante = 42 N m⁻¹). As imagens (512 pontos por linha) foram coletadas a uma velocidade de varredura de 1.0 Hz em uma área de varredura de 7,0 × 7,0 μm. Além disso, imagens foram obtidas e analisadas usando o software AFM Gwyddion (Santos et al, 2017).

5- RESULTADOS

PLATAFORMA SENSORA 1 E PATENTE

4.1. PATENTE



**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de
Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

Número do Processo: BR 10 2017 004291 0

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: Universidade Federal de Pernambuco

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 24134488000108

Nacionalidade: Brasileira

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 50670-901

País: Brasil

Telefone: (81)2126 8959

Fax: (81)2126 8959

Email: patentes_dine.propesq@ufpe.br

PROCESSO PARA DETECÇÃO ELETROQUÍMICA DA
LEISHMANIOSE UTILIZANDO NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS E FILME
ELETRODEPOSITADO DE MAGNETITA/ QUITOSANA/ POLIANILINA

Campo da Invenção

1. A presente invenção é aplicável à área do diagnóstico através do uso de biossensores eletroquímicos nanoestruturados, e refere-se a métodos e composições para identificação de patógenos. A invenção baseia-se na aplicação de uma sequência curta de oligonucleotídeos (sonda de DNA) ligados eletrostaticamente a superfície de nanopartículas de magnetita (NpsFe_3O_4), quitosana e polianilina para detecção de patógenos em amostras com baixas concentrações. Em particular, na presente invenção, foi desenvolvido um genossensor para a identificação de sequências específicas do DNA da *Leishmania chagasi* em amostras de pacientes cães infectados.
2. As nanopartículas apresentam diversas aplicações como carreadores para entrega controlada de fármacos, separação de proteínas e de células, detecção de patógenos e desenvolvimento de sensores eletroquímicos para o diagnóstico de diversas patologias. Outra aplicação para as partículas magnéticas é o seu uso para a marcação de moléculas biológicas, como por exemplo, anticorpos ou DNA, proporcionando também aplicações nas áreas médicas e veterinárias e no diagnóstico de doenças causadas por

diferentes patógenos. As nanopartículas de ouro também têm demonstrado vasto potencial em diferentes aplicações biológicas, incluindo a sua utilização no desenvolvimento de métodos diagnósticos altamente sensíveis. A polianilina (PANI) é um polímero condutor muito atrativo por causa de sua síntese fácil, estabilidade química e propriedades ambientais, já a quitosana é um biopolímero natural, abundante que apresenta excelente capacidade de formação de filme, baixa toxicidade, boa permeabilidade em água e elevada resistência mecânica. Diante de suas propriedades, a polianilina e a quitosana vem sendo utilizadas para montagens de plataformas sensoras.

Sumário

3. O invento aqui descrito é oriundo da aplicação de uma técnica simples para a obtenção de um filme polimérico eletrodepositado de PANI, nanopartículas magnéticas e quitosana e sua aplicação no desenvolvimento de biossensores com elevada sensibilidade e especificidade para o diagnóstico da leishmaniose. Desta forma, descrevemos um método de preparação por meio da técnica de eletrodeposição através da associação de magnetita/ quitosana/ polianilina sobre a superfície do eletrodo de ouro.
4. As nanopartículas da presente invenção combinam as propriedades do óxido de ferro, quitosana e polianilina, proporcionando diversas vantagens, dentre as quais podemos citar o aumento das propriedades elétricas e magnéticas. A fim de melhorar a sua biocompatibilidade e estabilidade há a conjugação desta com outros materiais, dentre os quais destacamos a quitosana e a polianilina. A quitosana é um biopolímero natural, abundante que apresenta excelente capacidade de formação de

filme, baixa toxicidade, boa permeabilidade em água e elevada resistência mecânica, o uso da quitosana na construção de sensores é uma alternativa para tornar o meio biocompatível permitindo a manutenção da atividade biológica da molécula. Este biopolímero juntamente com a polianilina (PANI) tem condições apropriadas para imobilização covalente, inclusive com grupamentos amina e estabilização das biomoléculas.

Anterioridades: Estado da Técnica

5. A Leishmaniose é uma doença parasitária causada pelo *Lutzomya longipalpis* (mosquito palha), sendo uma doença importante no contexto da saúde pública brasileira. Além ser encontrada em muitas regiões tropicais do mundo. A confirmação do diagnóstico da leishmaniose é tomada principalmente pelo diagnóstico direto. Algumas metodologias de teste de diagnóstico, tais como ELISA, imunoensaio de fluorescência indireta e PCR, são comumente usados para diagnosticar a leishmaniose. No entanto, estes métodos são geralmente complicados e demorados. Por isso o desenvolvimento de métodos sensíveis, rápidos e seletivos para a detecção da Leishmaniose é importante.
6. Recentemente, o uso de eletrodos nanoestruturados na área da química analítica vem se tornando uma tendência, a fim de melhorar a sensibilidade, seletividade e rendimento de sensores analíticos eletroquímicos e biossensores. Atribui-se o aumento do desempenho eletroanalítico de eletrodos nanoestruturados a sua alta condutividade, a grande área de superfície, a estabilidade e biocompatibilidade. Diferentes métodos de modificação de eletrodo

são utilizados para aumentar a sua sensibilidade e especificidade atenuando assim os inconvenientes inerentes na detecção do analito.

7. As nanopartículas magnéticas vêm ganhando destaque nas aplicações biológicas, como a aplicação de diferentes formas de óxido de ferro, o óxido de ferro (II) FeO ; óxido férrico (III) Fe_2O_3 e óxido de ferro (II, III) Fe_3O_4 para procedimentos diagnósticos como ressonância magnética nuclear (RMN), carreador magnético de drogas, catálise e liberação controlada de drogas e tratamento de câncer por hipertermia magnética. As aplicações terapêuticas exploram as duas maiores vantagens dos óxidos de ferro: sua baixa toxicidade em seres humanos e a possibilidade de se controlar sua magnetização. Nos biossensores as nanopartículas magnéticas são usadas com bastante sucesso, possuem alta eficiência de imobilização, e devido a sua alta área superficial, as nanopartículas podem aumentar a quantidade de biomolécula imobilizada, consequentemente aumentando a sensibilidade.
8. Esforços vêm sendo empregados, como objetivo de elaborar metodologias eficientes no diagnóstico e prevenção desta doença, como, por exemplo, a patente Pat. WO 2014160844 A2, que se refere ao processo para a preparação de nanopartículas magnéticas que resulta em nanopartículas muito sensíveis que podem ser usados em uma variedade de métodos de diagnóstico e analíticos, especialmente em biossensores. Em termos gerais, essa patente fornece nanopartículas magnéticas (MNPs) com uma pequena distribuição de tamanhos e alta susceptibilidade de corrente alternada que pode ser usado numa variedade de aplicações.

9. Também são conhecidas as patentes Pat. EP2631300 A1, que divulga a construção de sondas de oligonucleótidos altamente específicos que podem ser utilizados para a identificação de Leishmania e, ao mesmo tempo para a conjugação com AuNPs. A patente WO 2015114506 A2, que descreve um biosensor para a determinação de uma infecção e possíveis neoplasias associados com ele. As patentes WO2016005517A1; US 20120228155 A1, descrevem métodos de diagnóstico, seja baseado na detecção de DNA, seja pela utilização de moléculas alvo em fase líquida. A presente invenção difere das demais supracitadas porque nenhuma delas utiliza sistemas de biossensores com dispositivos nanoestruturados baseados em nanopartículas de magnetita e filme eletrodepositado de magnetita/quitosana/polianilina no seu desenvolvimento.
10. A presente invenção mostra um processo de síntese e obtenção de nanopartículas magnéticas e filme polimérico eletrodepositado de PANI e quitosana e sua aplicação no desenvolvimento de biossensores eletroquímico visando sua utilização principalmente, mas não restrita, na área biomédica.
11. Muito embora tais documentos apresentem semelhança em relação à presente patente, as diferenças existentes podem ser observadas através da comparação entre esses documentos que pode ser visualizada na Tabela I abaixo.

12. Tabela I - comparação entre as componentes características de cada invento

	Invento apresentado	WO 2014160844 A2	EP2631300 A1	WO 2015114506 A2
Partícula metálica	Não	Não	Sim	Sim
Polímero	Sim	Sim	Não	Não
Sequência de DNA	Sim	Não	Sim	Não
Anticorpos	Não	Não	Não	Sim
Nanopartícula magnética e filme eletrodepositado de magnetita/ quitosana e polianilina	Sim	Não	Não	Não

Problemas e Limitações do Estado da Técnica

13. O principal problema encontrado no estado presente da técnica é a limitação da quantidade da sonda de DNA imobilizada no genossensor, assim como a sensibilidade da sonda para a detecção desta hibridação. A fim de reverter esta situação e aumentar a quantidade de hibridação bem como a sensibilidade de sua detecção usamos os nanomateriais, nanopartículas de magnetita e filme eletrodepositado de magnetita/quitosana/polianilina para fazer modificações na superfície do eletrodo, pois são indicadas para este fim devido a sua elevada área superficial e excelentes propriedades eletroquímicas. Podemos assim desenvolver um dispositivo específico, de alta sensibilidade e economicamente viável.

Objetivos da Invenção

14. O objetivo da presente invenção é apresentar um biossensor voltamétrico nanoestruturado com nanopartículas de magnetita e filme eletrodepositado de magnetita/quitosana/polianilina e sua obtenção através de eletrodeposição. A presente invenção evita e dispensa a necessidade de marcadores, uma vez que esta técnica revela alterações nas propriedades elétricas da superfície, tal como a corrente elétrica que têm uma resposta representativa a partir da presença da molécula alvo, sem marcadores.

15. A presente invenção também tem como objetivo o desenvolvimento de novos sistemas eletroquímicos em escala nanométrica para produção em larga escala e de baixo custo operacional.

Solução

16. O ato inventivo relacionado com a presente invenção é a obtenção de um biossensor eletroquímico modificado com filme eletrodepositado de magnetita/quitosana/polianilina que fornecerá um diagnóstico rápido e preciso. Isso faz com que este dispositivo forneça a vantagem em comparação aos métodos atuais de diagnóstico da leishmaniose de apresentar-se como uma técnica com economia de tempo e custo.

Vantagens

17. Uma das vantagens é a junção das propriedades elétricas e magnéticas, proporcionando o desenvolvimento de dispositivos eletroquímicos mais eficientes, pois as combinações de distintas propriedades possibilitam potenciais aplicações.

18. Por causa da sua simplicidade, a técnica da hibridação é a mais comumente usada nos diagnósticos laboratoriais do que o método de sequenciamento direto, na análise de sequência gênica específica.

hibridação do DNA, a sequência gênica alvo é identificada por meio de uma sonda de DNA que forma um híbrido de dupla hélice com o seu ácido nucléico complementar, sendo esse reconhecimento altamente eficiente e específico. O Transdutor eletroquímico (eletrodo) de DNA apresenta a vantagem de apresentar uma grande diversidade de suportes utilizados e pela facilidade de modificação dos mesmos. Após modificação com a sonda de DNA, o eletrodo então produzido, é capaz de detectar eletroquimicamente a molécula complementar de DNA, apresentando-se como uma promissora ferramenta para aplicação na área biomédica.

19. O biodispositivo da invenção mostra respostas satisfatórias frente a diferentes concentrações de DNA alvo na amostra analisada, além de ser de fácil manuseio, o que é uma vantagem, pois permite sua aplicação em laboratórios de análises clínicas, além de laboratórios de ensino e pesquisa.

A novidade e o efeito técnico alcançado

20. Resumindo, a novidade da presente invenção é a metodologia

diagnóstica utilizando biossensores modificados com filme eletrodepositado de magnetita/quitosana/polianilina, onde até o presente momento, não havia sido identificada por nenhuma outra instituição de pesquisa ou ensino ou mesmo descrito na literatura para o uso como sensor de Leishmaniose, já que os atuais métodos de detecção limitações, dentre elas: baixa sensibilidade, especificidade, alto custo, tempo elevado de diagnóstico; o atual método combina todas essas vantagens para detecção da doença, baseando-se na hibridização da fita complementar de DNA.

Descrição Detalhada

21. Os exemplos a seguir não têm o intuito de limitar o escopo da invenção, mas sim de somente ilustrar uma das inúmeras maneiras de se realizar a invenção.
22. Resumidamente consegue-se chegar à invenção primeiramente pela montagem do nanocompósito. Para montar o nanocompósito juntou-se 0,001ng de nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4) e 1 mL de quitosana colocadas sob sonicação por 30min, em seguida adicionado 10mL de HCL (0,5M) e 180 μL de anilina.
23. O procedimento seguido para preparar o biossensor foi o seguinte: O eletrodo foi polido com uma lixa com água deionizada, seguido por imersão em solução de hipoclorito de sódio durante aproximadamente 10 minutos e secou-se à temperatura ambiente.

Após lavagem com água deionizada o eletrodo foi imediatamente imerso na solução de eletrodeposição magnetita/quitosana/polianilina (10mL) onde foram realizados 30 ciclos, a fim de obter o filme de magnetita/ quitosana polianilina. Seguida a lavagem foi adicionado o Primer e incubado durante 30 minutos para se obter o sistema $\text{NpsFe}_3\text{O}_4/\text{Quit}/\text{PANI-Primer}$, posteriormente a incubação do genoma foi realizada por um período de tempo 30 minutos e, finalmente, a amostra com o DNA-alvo pelo mesmo período (Fig.16). A lavagem foi executada com água deionizada após cada incubação. O exemplo a seguir mostra um caso mais específico de realização.

24. Exemplo 1. Síntese e caracterização das nanopartículas

25. Preparação de Nanopartículas

26. As nanopartículas foram obtidas através do método de co-precipitação.

Cerca de 200 mL da solução de $\text{FeCl}_3 \cdot 0,1 \text{ M} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e 0,5 M de solução aquosa de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ foram colocadas num balão de fundo redondo e mantidas sob agitação intensa, numa atmosfera isenta de oxigênio durante 30 min, até atingir o pH de 1,7. Posteriormente 500 μL de hidróxido de amônio foram adicionados gota a gota. A mistura então foi agitada a 60 ° C durante 6 horas sob atmosfera de N_2 . As NPsFe_3O_4 não revestidas foram eliminadas por meio de lavagem com 0,1 M HCl.

Caracterização de Nanopartículas

27. As análises voltamétricas foram realizadas com potenciostato / galvanostato PGSTAT 128N (Autolab, Holanda), em uma célula eletroquímica de três eletrodos, imersos numa solução de 10 mM de ferro- ferricianeto de potássio $K_4[Fe(CN)_6]^{4-}/K_3[Fe(CN)_6]^{3-}$ na proporção (1:1) usada como uma sonda redox. A superfície do eletrodo de trabalho foi de ouro. Eletrodos de fio de platina e Ag / AgCl (solução saturada de KCl) foram usados como eletrodo auxiliar e de referência, respectivamente. Análise voltamétricas foram realizadas em um intervalo de potenciais entre 0,7 V e -0,2V a uma taxa de varredura de $50mVs^{-1}$. A eletrodeposição foi realizada numa faixa de potencial de -0,1 a 1,0 V vs Ag / AgCl ciclado 30 vezes a uma velocidade de varredura de $50 mV.s^{-1}$.

Características das nanopartícula

28. O artifício utilizado na construção do biodispositivo foi a imobilização de uma sequência específica do DNA da *Leishmania infantum*, na superfície do eletrodo que vai se ligar a sequência alvo através de processos de hibridação. Empregamos ainda diferentes concentrações deste DNA alvo que foram imobilizados para testar a sensibilidade do dispositivo aqui descrito.
29. A Fig. 17 mostra os voltamogramas cíclicos do processo de montagem do biossensor, onde podemos observar no voltamograma em preto as correntes de picos anódicos (I_{pa}) e catódicos (I_{pc}) bem definidos, o que é característico de um processo limitado por difusão. Com a adição de $NPsFe_3O_4/Quit/PANI$ vemos a diminuição acentuada destes picos, caracterizando assim a aderência do nanocompósito à superfície do eletrodo (voltamograma vermelho). Após a adição do primer de leishmaniose (Primer_{Leish}) observa-se uma nova redução dos I_{pa} e I_{pc} (azul), onde esta diminuição dos picos reflete a

interação eletrostática entre o nanocompósito e o primer, comprovando assim a ligação e formação da camada sensora NPsFe₃O₄/ Quit/PANI-Primer_{Leish}.

30. A Fig. 18 mostra os voltamogramas cíclicos do sistema sensor referentes as análises com o genoma 0,5ng e suas respectivas diluições (1:500/1:100/1:50), mostrando assim que houve hibridação e reconhecimento da sequência complementar. No voltamograma cíclico é possível observar que após cada etapa de modificação do eletrodo de ouro, há uma queda da resposta amperométrica do sistema, como também observa-se que quanto maior a concentração do genoma, menor são as correntes de pico anódicas e catódicas.

31. A Fig. 19 mostra os voltamogramas cíclicos do processo de bioreconhecimento do biossensor frente as amostras clínicas de cães infectados (DNA). No voltamograma cíclico podemos observar que foram analisadas uma amostra concentrada (10ng) e a mesma diluída em várias concentrações (1ng/0,1ng/0,01ng/0,001ng/ 0,0001ng), mostrando assim a viabilidade e sensibilidade de utilização do sistema sensor, onde avaliando cada resposta do voltamograma cíclico, pode-se observar que quanto mais concentrada a amostra, menores são as correntes de pico anódicas e catódicas, mostrando que quando aplicado o potencial sobre o eletrodo de trabalho, há um maior impedimento de passagem da corrente de elétrons. A Fig. 20 mostra a relação da concentração do analito alvo com as magnitudes da corrente de pico anódica extraída. A Fig. 21 mostra a análise morfológica por microscopia de força atômica.

Figuras:

32. A Figura 1 apresenta a representação esquemática da construção do biossensor $\text{NPsFe}_3\text{O}_4/\text{Quit/PANI-Primer}_{\text{Leish}}$
33. A Figura 2 apresenta a voltametria cíclica das etapas de montagem do biossensor
34. A Figura 3 apresenta a voltametria cíclica após a montagem do sistema $\text{NPsFe}_3\text{O}_4/\text{Quit/PANI-Primer}_{\text{Leish}}$ -Genoma
35. A Figura 4 apresenta a voltametria cíclica do sistema sensor frente as amostras clínicas de cães infectados

Referências:

36. Souto D.E., Silva J.V., Martins H.R., Reis A.B., Luz R.C., Kubota L.T. and Damos F.S., 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**:22-29 (2013).
37. Diniz L.M.O., Duani H., Freitas C.R., Figueiredo R.M. and Xavier C.C., Neurological involvement in visceral leishmaniasis: case report, *Rev Soc Bras Med Trop* **43**:743-745 (2010).
38. Drummond TG, Hill MG and Barton JK, Electrochemical DNA sensors, *Nat Biotechnol* **21**:1192-1199 (2003).

39. Xue D, Elliott CM, Gong P, Grainger DW, Bignozzi CA and Caramori S, Indirect electrochemical sensing of DNA hybridization based on the catalytic oxidation of cobalt(II), *J Amer Chem Soc* **129**:1854-1855 (2007).
40. Ravindranadh K and Rao MC, Physical properties and applications of conducting polymers: An Overview, *Int J Adv Pharm Biol Chem* **2**:190-200 (2013).
41. Fang FF, Choi HJ and Joo J, Conducting polymer/clay nanocomposites and their applications, *J Nanosc Nanotechnol* **8**:1559-1581 (2008).

FIGURAS

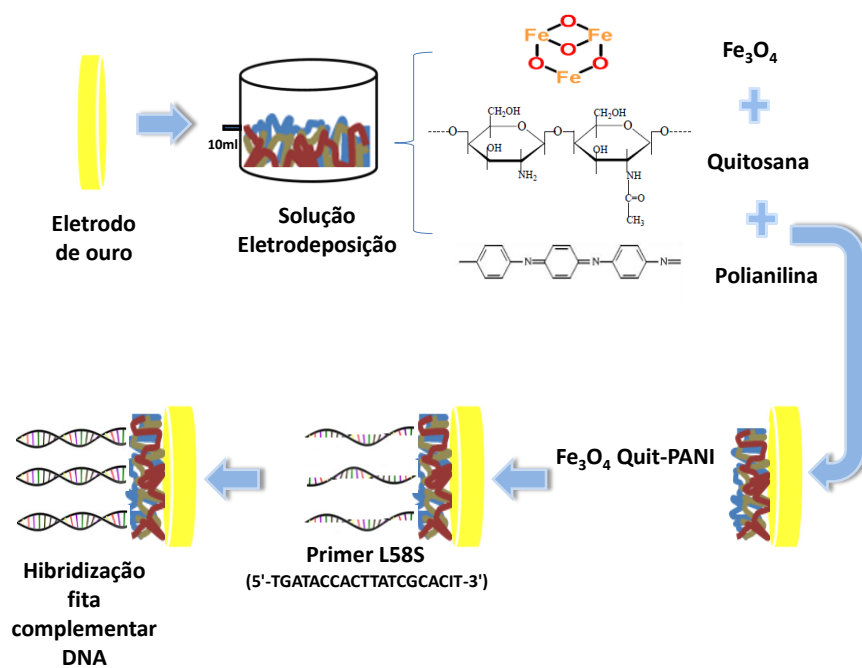


Figura 18- Representação esquemática sistema sensor Nps Fe_3O_4 /Quit/PANI-Primer_{Leishmania}

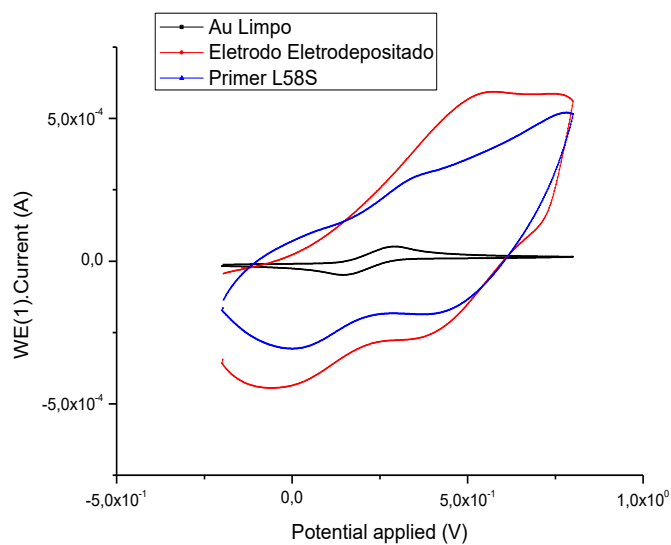


Figura 19- Montagem do sistema sensor $\text{NpsFe}_3\text{O}_4/\text{Quit}/\text{PANI-Primer}_{\text{Leishmania}}$

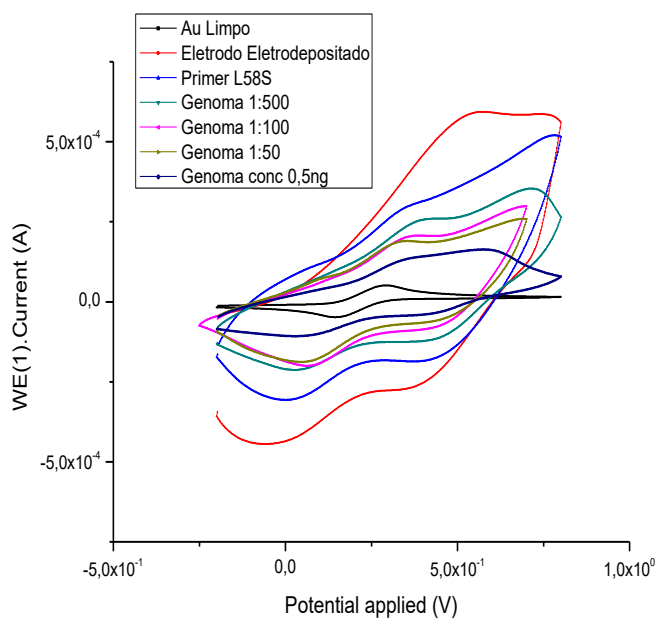


Figura 20- Teste do sistema sensor $\text{NpsFe}_3\text{O}_4/\text{Quit}/\text{PANI-Primer}_{\text{Leishmania}}$ frente as amostras dos genomas dos cães.

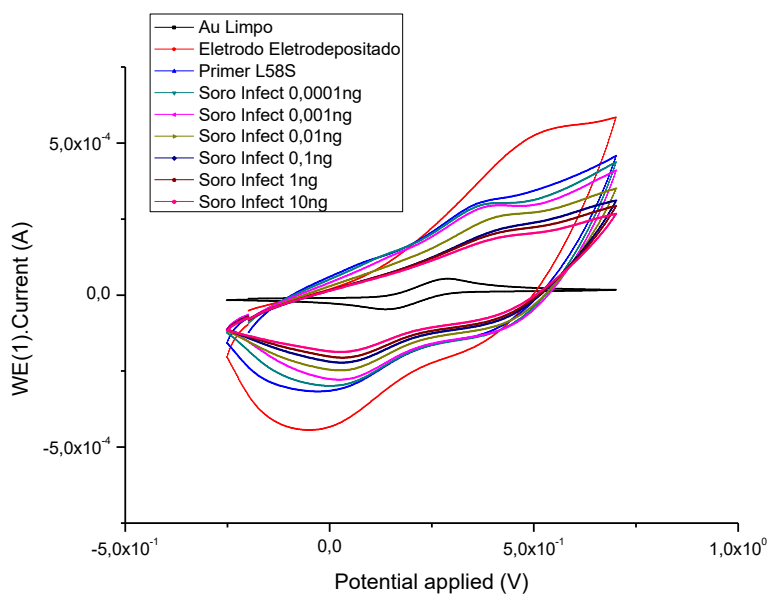


Figura 21- Teste do sistema sensor $\text{NpsFe}_3\text{O}_4/\text{Quit}/\text{PANI-Primer}_{\text{Leishmania}}$ frente as amostras de cães contaminados com leishmaniose.

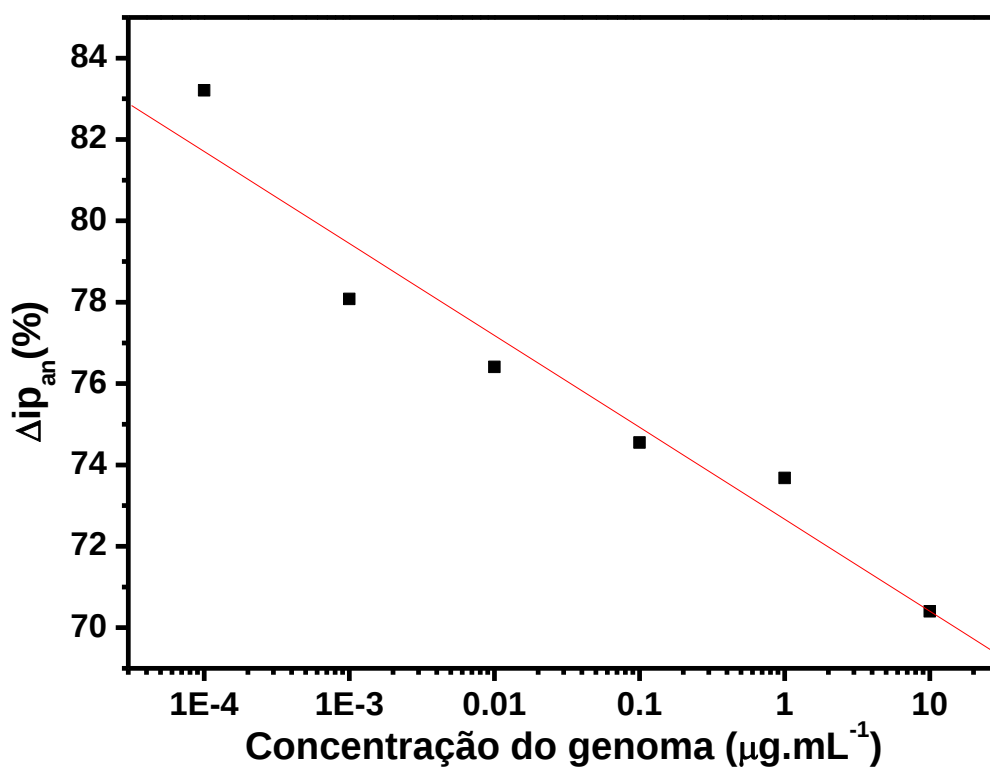


Figura 22- concentração do analito alvo com as magnitudes da corrente de pico anódica extraída

Análise morfológica AFM

A figura 21 mostra a superfície modificada por PANI-Quit-Fe₃O₄, com a presença de picos distribuídos ao longo da superfície e rugosidade de 32nm. Posteriormente, após modificação com o primer podemos notar uma distribuição mais heterogênea da superfície e um aumento da rugosidade 65nm (b). Além dessas análises da topografia, foi testado uma amostra negativa (c), o resultado mostra que não houve significância na alteração da superfície 72nm. Diferentemente dos resultados obtidos com o genoma e soro cão, onde a superfície foi modificada para 0,15 µm e 0,18µm respectivamente, mostrando que o sistema PANI-Quit-Fe₃O₄ responde positivamente a essas amostras de leishmaniose.

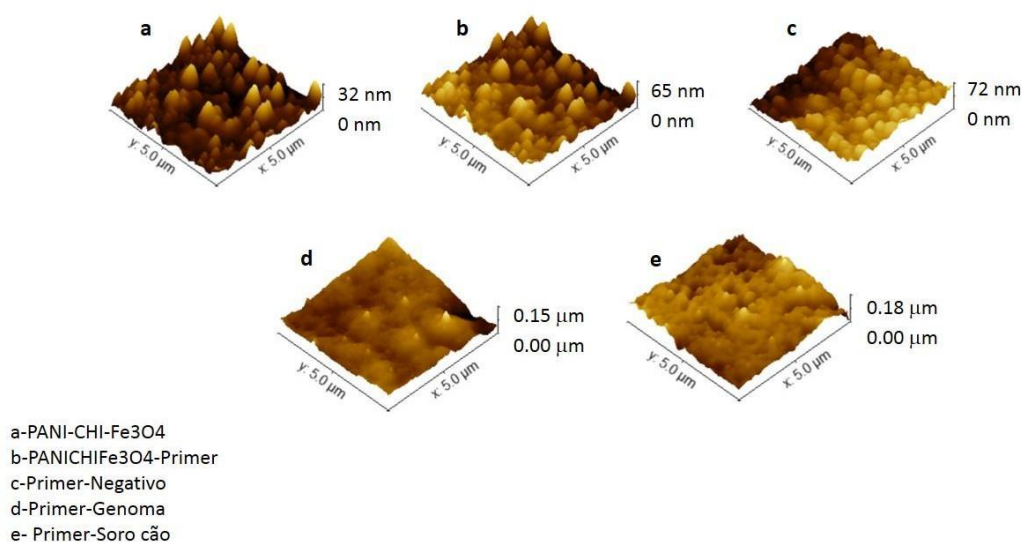


Figura 23- Microscopia de força atômica

ESTUDO DE INTERFERENTES SISTEMA Nps Fe₃O₄/Quit/PANi

1- Glicogênio

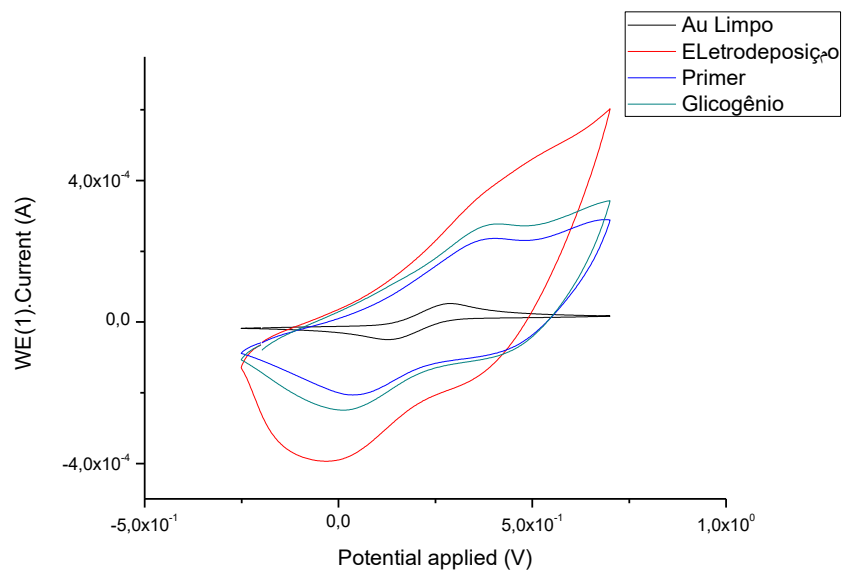


Figura 24- Estudo de interferentes do sistema Nps Fe₃O₄/Quit/PANi, utilizando glicogênio.

2- Colesterol

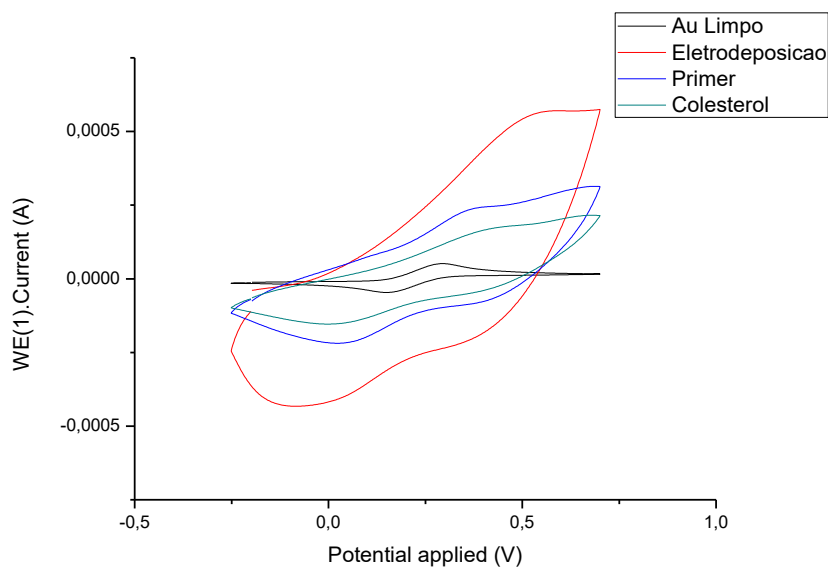


Figura 25- Estudo de interferentes do sistema Nps Fe₃O₄/Quit/PANi, utilizando colesterol.

3- Ácido ascórbico

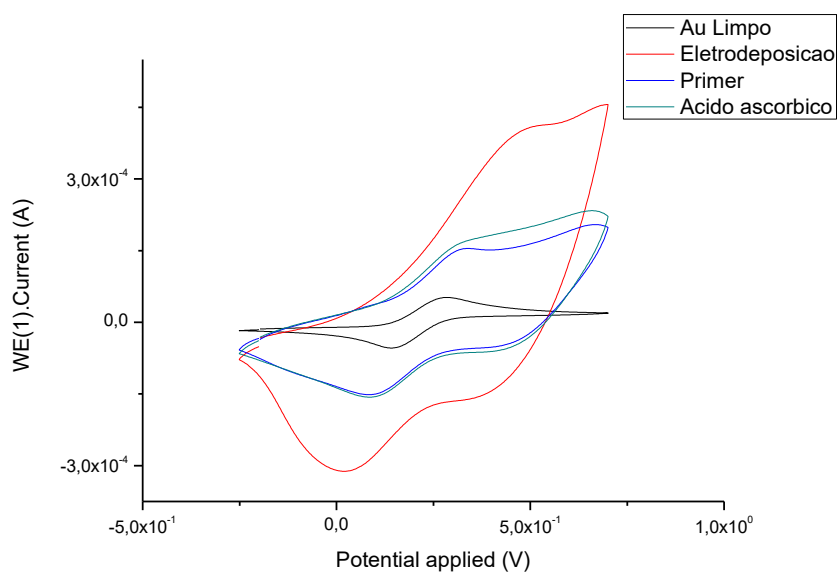


Figura 26- Estudo de interferentes do sistema Nps Fe_3O_4 /Quit/PANi, utilizando àcido ascórbico.

4- N-acetilglicosamina

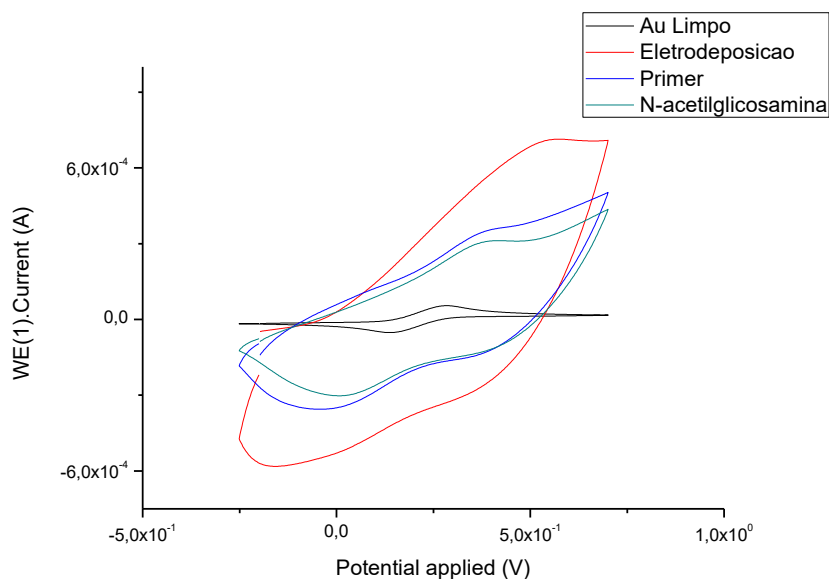


Figura 27- Estudo de interferentes do sistema Nps Fe_3O_4 /Quit/PANi, utilizando n-acetilglicosamina.

TESTE AMOSTRA NEGATIVA

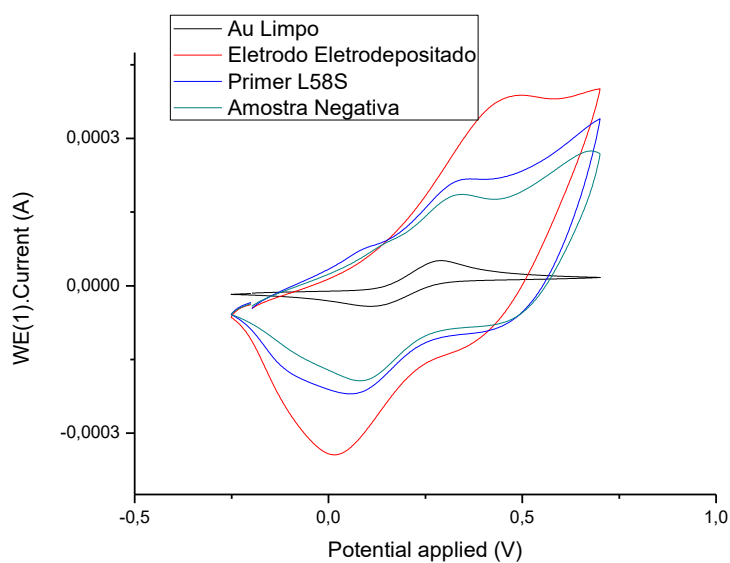


Figura 28- Estudo do sistema Nps $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Quit}/\text{PANi}$, utilizando amostra negativa

TESTE DE DEHIBRIDIZAÇÃO

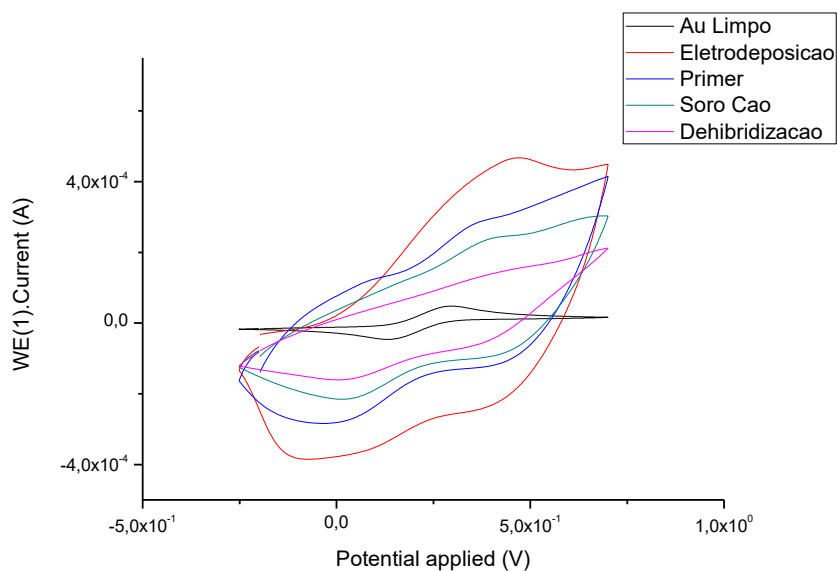


Figura 29- Estudo do sistema Nps $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Quit}/\text{PANi}$, realizando teste de hibridização.

CORRENTES DE PICO

Correntes de pico

Δi -

$$\text{Primer} - \text{genoma/genoma} \times 100 = \%$$

Δi	
Eletrodo Eletrodepositado	45%
Soro cão 10ng	70,40%
Soro cão 1ng	73,68%
Soro cão 0,1ng	74,55%
Soro cão 0,01ng	76,41%
Soro cão 0,001ng	78,08%
Soro cão 0,0001ng	83,21%
Genoma 0,5ng	64,8%
Genoma 1:50	26,08%
Genoma 1:100	7,17%
Genoma 1:500	84,11%
Negativo	6,48%

PLATAFORMA SENSORA 2 E PATENTE

5.1. PATENTE

DISPOSITIVO NANOELETRÓQUÍMICO PARA DETECÇÃO DE
LEISHMANIA CHAGASI BASEADO EM PARTÍCULAS DE ÓXIDO DE
ZINCO

PEDIDO DE PATENTE PROTOCOLO: 23076.044012/2018-03

DISPOSITIVO NANOELETRQUÍMICO PARA DETECÇÃO DE LEISHMANIA CHAGASI BASEADO EM PARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO

Campo da Invenção

1. A presente invenção é aplicável à área do diagnóstico através do uso de plataformas sensoras eletroquímicas nanoestruturadas, e refere-se a métodos e composições para identificação de patógenos. A invenção baseia-se na aplicação de uma sequência curta de oligonucleotídeos (sonda de DNA) ligadas quimicamente a nanopartículas metálicas de óxido de zinco aminadas (ZnONps-NH_3) à superfície do eletrodo de ouro previamente modificado com a camada automontada de ácido 3-mercaptopropiônico (AMP) para detecção de patógenos em amostras com baixas concentrações. Em particular, na presente invenção, foi desenvolvido um genossensor para a identificação de sequências específicas do DNA de Leishmania em soro de humanos e cães.
2. As nanopartículas metálicas apresentam diversas aplicações tais como, possibilidade de atuar como carreadores para entrega controlada de fármacos, separação de proteínas e células, bem como no desenvolvimento de sensores eletroquímicos para o diagnóstico de diversas patologias. Outra aplicação para as partículas metálicas é o seu uso para a marcação de moléculas biológicas, como por exemplo, anticorpos ou DNA, proporcionando também aplicações nas áreas médicas e veterinárias.
3. As nanopartículas de óxido de zinco (ZnONps), apresentam um notável potencial de utilização devido a sua estabilidade física e química, alta capacidade oxidativa, baixo custo, alta disponibilidade e baixa toxicidade. Além disso, as ZnONps possuem estabilidade a longo prazo, alta sensibilidade e confere provável aumento do sinal

eletroquímico. O AMP também foi utilizado já que ele constitui uma alternativa vantajosa, por ser um alcanotiol de cadeia curta, o que viabiliza a transferência de elétrons e diminui o tempo de formação de monocamadas. Além disso, o AMP possui grupos carboxílicos terminais o que viabiliza a imobilização de biomoléculas, seja pela interação eletrostática ou pela utilização de agentes químicos ativadores para a formação de ligação cruzada. Diante de suas propriedades, as nanopartículas de óxido de zinco e o ácido 3-mercaptopropiônico vêm sendo utilizados na montagem de plataformas sensoras.

4. Sumário

5. O invento aqui descrito é oriundo da aplicação de uma técnica simples para a obtenção de nanopartículas de óxido de zinco modificadas com o grupamento amina posteriormente ligadas a camada de AMP e sua aplicação no desenvolvimento de biossensores com elevada sensibilidade e especificidade para o diagnóstico da leishmaniose. Desta forma, descrevemos um método de preparação por meio da técnica de automontagem através da associação de AMP-ZnONps-NH₃ sobre a superfície do eletrodo de ouro.

6. As nanopartículas da presente invenção têm áreas de superfície elevadas e propriedades físico-químicas únicas fazendo delas ideais para o desenvolvimento de sistemas de biossensoriamento. O uso das ZnONps na preparação de biossensores eletroquímicos se deve às suas características, como estabilidade física e química, alta capacidade oxidativa, baixo custo, alta disponibilidade e baixa toxicidade. Além disto, o AMP proporciona o aumento da transferência de elétrons e a imobilização de biomoléculas na superfície do eletrodo.

7. Anterioridades: Estado da Técnica

8. A Leishmaniose é uma doença parasitária causada pelo *Lutzomyia longipalpis* (mosquito palha), sendo uma doença importante no contexto da saúde pública brasileira, além ser encontrada em muitas regiões tropicais do mundo. A confirmação do diagnóstico da leishmaniose é tomada principalmente pelo diagnóstico direto que se baseia na detecção do parasito em secreções (microscopia direta). Algumas metodologias de teste de diagnóstico, tais como enzima imunoensaio (do inglês Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA), imunoensaio de fluorescência indireta e reação da cadeia da polimerase (do inglês Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, PCR), são comumente usados para o seu diagnóstico. No entanto, estes métodos apresentam etapas adicionais de processamento de amostras e necessidade de pessoal técnico treinado. Por isso, o desenvolvimento de métodos sensíveis, rápidos e seletivos para a detecção da Leishmaniose é importante.
9. Recentemente, o uso de eletrodos nanoestruturados na área da química analítica vem se tornando uma tendência, a fim de melhorar a sensibilidade, seletividade e rendimento de sensores analíticos eletroquímicos e biossensores. Atribui-se o aumento do desempenho eletroanalítico dos eletrodos nanoestruturados a sua alta condutividade, a grande área de superfície, a estabilidade e biocompatibilidade. Diferentes métodos de modificação de eletrodo são utilizados para aumentar a sua sensibilidade e especificidade atenuando assim os inconvenientes inerentes na detecção do analito.
10. As ZnONps vêm sendo largamente empregadas no desenvolvimento de métodos para análises de amostras biológicas. Destacamos os numerosos métodos que têm sido desenvolvidos para a identificação de sequências de DNA tais como a as técnicas ópticas, elétricas e gravimétricas. Todos estes procedimentos oferecem diferentes vantagens para a detecção de alvos específicos de sequência de DNA. Nos biossensores as nanopartículas metálicas são utilizadas

com bastante sucesso, pois possuem alta eficiência de imobilização, e devido a sua alta área superficial, as nanopartículas podem aumentar a quantidade de biomolécula imobilizada, consequentemente aumentando a sua sensibilidade.

11. Esforços vêm sendo empregados, com o objetivo de elaborar metodologias eficientes no desenvolvimento de biossensores, por exemplo, a patente Pat. WO 2014016465 A1, que se refere ao campo da biotecnologia, especificamente ao campo de biossensores com nanopartículas metálicas como sistema de transdução de sinal. Que resulta em sistemas muito sensíveis que podem ser usados em uma variedade de métodos de diagnósticos e analíticos, especialmente em biossensores.
12. O desenvolvimento de novas metodologias diagnósticas da leishmaniose tem atraído bastante atenção, por exemplo, a patente ES2356439 B1 que se refere ao uso de oligonucleotídeos de cadeia simples (aptâmeros) que são capazes de se ligar especificamente às proteínas histonas de microrganismos do gênero *Leishmania*, bem como às utilizações dos referidos oligonucleotídeos para o diagnóstico e tratamento de leishmaniose. Também são conhecidas as patentes Pat. EP2631300 A1, que divulga a construção de sondas de oligonucleotídeos altamente específicos que podem ser utilizados para a identificação de *Leishmania* e, ao mesmo tempo para a conjugação com AuNPs.
13. Em adição, as patentes WO2016005517A1; US 20120228155 A1, descrevem métodos de diagnóstico, seja baseado na detecção de DNA, seja pela utilização de moléculas alvo em fase líquida. A presente invenção difere das demais supracitadas porque nenhuma delas utiliza sistemas de biossensores com dispositivos nanoestruturados baseados em ZnONps e AMP no seu

desenvolvimento.

14. A presente invenção mostra um processo de síntese e obtenção de nanopartículas de óxido de zinco modificadas com o grupamento amina e sua aplicação no desenvolvimento de biossensores eletroquímico visando sua utilização principalmente, mas não restrita, na área biomédica.

15. Muito embora tais documentos apresentem semelhança em relação a presente patente, as diferenças existentes podem ser observadas através da comparação entre esses documentos que pode ser visualizada na Tabela I abaixo.

16. Tabela I - comparação entre as componentes características de cada invento

	Invento apresentado	WO2014016465	ES2356439	WO 2015114506
		A1	B1	A2
Partícula	Sim	Sim	Não	Sim
Metálica				
Polímero	Não	Não	Não	Não
Sequência de	Sim	Não	Sim	
DNA				Não
Anticorpos	Não	Não	Não	Sim
Nanopartícula	Sim	Não	Não	Não
de óxido de				
zinco aminada				

17. Problemas e Limitações do Estado da Técnica

18. O principal problema encontrado no estado da técnica é a limitação da quantidade da sonda de DNA imobilizada no genossensor, assim como da sensibilidade da sonda para a detecção desta hibridação. A fim de reverter esta situação e aumentar a quantidade de hibridação bem como a sensibilidade de sua detecção usamos os nanomateriais. As nanopartículas de óxido de zinco aminada foram utilizadas para fazer modificações na superfície do eletrodo, pois são indicadas para este fim devido a sua elevada área superficial e excelentes propriedades eletroquímicas. Podemos assim desenvolver um dispositivo específico, de alta sensibilidade e economicamente viável.

19. Objetivos da Invenção

20. O objetivo da presente invenção é apresentar um biossensor eletroquímico nanoestruturado com nanopartículas de óxido de zinco aminada. A presente invenção evita e dispensa a necessidade de marcadores, uma vez que esta técnica revela alterações nas propriedades elétricas da superfície, tal como a corrente elétrica que têm uma resposta representativa a partir da presença da molécula alvo, sem marcadores.

21. A presente invenção também tem como objetivo o desenvolvimento de novos sistemas eletroquímicos em escala nanométrica para produção em larga escala e de baixo custo operacional.

22. Solução

23. O ato inventivo relacionado com a presente invenção é a obtenção de um biossensor eletroquímico modificado com nanopartículas de óxido

de zinco aminada que fornecerá um diagnóstico rápido e preciso. Isso faz com que este dispositivo forneça a vantagem em comparação aos métodos atuais de diagnóstico da leishmaniose e apresentar-se como uma técnica com economia de tempo e custo.

24. Vantagens

25. Uma das vantagens é a junção das propriedades elétricas e metálicas, proporcionando o desenvolvimento de dispositivos eletroquímicos mais eficientes, pois as combinações de distintas propriedades possibilitam potenciais aplicações.

26. Por causa da sua simplicidade, a técnica da hibridação é a mais comumente usada nos diagnósticos laboratoriais do que o método de sequenciamento direto, na análise de sequência gênica específica. Na hibridação do DNA, a sequência gênica alvo é identificada por meio de uma sonda de DNA que forma um híbrido de dupla hélice com o seu ácido nucléico complementar, sendo esse reconhecimento altamente eficiente e específico. O Transdutor eletroquímico apresenta a vantagem de apresentar uma grande diversidade de suportes utilizados e pela facilidade de modificação dos mesmos. Após modificação com a sonda de DNA, o eletrodo então produzido, é capaz de detectar eletroquimicamente a molécula complementar de DNA, apresentando-se como uma promissora ferramenta para aplicação na área biomédica.

27. O biodispositivo da invenção mostra respostas satisfatórias frente a diferentes concentrações de DNA alvo na amostra analisada, além de ser de fácil manuseio, o que é uma vantagem, pois permite sua aplicação em laboratórios de análises clínicas, além de laboratórios

de ensino e pesquisa.

28. A novidade e o efeito técnico alcançado

29. Resumindo, a novidade da presente invenção é a plataforma diagnóstica utilizando biossensores modificados com nanopartículas de óxido de zinco aminada, onde até o presente momento, não havia sido identificada por nenhuma outra instituição de pesquisa ou ensino ou mesmo descrito na literatura para o uso como sensor para Leishmaniose, já que os atuais métodos de detecção têm limitações, dentre elas: baixa sensibilidade, especificidade, alto custo, tempo elevado de diagnóstico; o atual método supera todas essas limitações para a detecção da doença, baseando-se na hibridação da fita complementar de DNA.

30. Descrição Detalhada

31. Os exemplos a seguir não têm o intuito de limitar o escopo da invenção, mas sim de somente ilustrar uma das inúmeras maneiras de se realizar a invenção.

32. Resumidamente consegue-se chegar à invenção primeiramente pela síntese das nanopartículas de óxido de zinco aminada e sua ligação ao eletrodo de ouro previamente modificado com AMP.

33. O procedimento seguido para preparar o biossensor foi o seguinte: O eletrodo de ouro foi polido com alumina 0,5 μ m e submetido à ultrassonicação por 1 minuto em água deionizada, e posteriormente seco com nitrogênio (N₂). 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 na solução de AMP por 60 min (4µL), após isso se modificou a superfície com EDC:NHS (1- Etil-3-(3-dimetilaminopropil-carbodiimida/ N-hidroxisuccinimida) por 15 min e ZnONps-NH₃ por 20 min. Concluída essas etapas o sistema sensor foi exposto a amostra contendo a sequência de oligonucleotídeo de Leishmania (OligLeish). Após obtenção do eletrodo modificado com AMP-ZnONps-NH₃- OligLeish este sistema foi submetido a incubação com o genoma de pacientes contaminados com genoma de *L. chagasi* (30min) diluídos em tampão fosfato de sódio (TFS) pH 7,4 (Fig.1). A lavagem foi executada com água deionizada após cada incubação. O exemplo a seguir mostra um caso mais específico de realização.

34. Síntese e caracterização das nanopartículas

35. Preparação de Nanopartículas

36. As nanopartículas foram obtidas da seguinte maneira: 1,5 g de óxido de zinco foi disperso em água destilada ($v = 50\text{mL}$, pH 6,8), o pH inicial foi ajustado para 6,5 com ácido nítrico (HNO₃). A solução foi agitada durante 1 hora e posteriormente 1 mL de 3-aminopropiltrietoxilano (APTES) foi acrescido a solução para obtenção das nanopartículas de ZnONps modificadas com NH₃ (ZnONps-NH₃). Após adição do APTES o pH elevou-se para 8,9 devido a propriedade básica dos grupamentos amino. A solução ficou sob agitação por 24h horas e, posteriormente, o excesso de APTES foi removido por filtração, lavado com álcool e acetona, e o pó obtido foi seco a 60°C sob vácuo.

37. Caracterização das Nanopartículas

38. As análises impedimétricas e amperométricas foram realizadas com o auxílio de um potenciostato / galvanostato PGSTAT 128N (Autolab, Holanda), em uma célula eletroquímica de três eletrodos, imersos numa solução de 10 mM de ferro-ferricianeto de potássio $K_4[Fe(CN)_6]^{4-}/K_3[Fe(CN)_6]^{3-}$ na proporção (1:1) usada como uma sonda redox. A superfície do eletrodo de trabalho foi de ouro. Eletrodos de fio de platina e Ag/AgCl (solução saturada de KCl) foram usados como eletrodo auxiliar e de referência, respectivamente. Análise voltamétricas foram realizadas em um intervalo de potenciais entre - 0,2 V e 0.7 V a uma velocidade de varredura de 50 mV.s^{-1} e os experimentos impedimétricos foram realizados a uma frequência entre 100 mHz e 100 kHz, com um potencial de 10 mV aplicado.

39. Características das nanopartículas

40. O artifício utilizado na construção do biodispositivo foi a imobilização de uma sequência específica do DNA de *Leishmania chagasi*, na superfície do eletrodo modificado com as nanopartículas que vai se ligar a sequência alvo através de processos de hibridação. Empregamos ainda diferentes concentrações deste DNA alvo que foram imobilizados para testar a sensibilidade do dispositivo aqui descrito.

41. A Fig. 2 mostra os voltamogramas cíclicos do processo de montagem do biossensor, onde podemos observar no voltamograma em preto as correntes de picos anódicos (I_{pa}) e catódicos (I_{pc}) bem definidos (eletrodo limpo), o que é característico de um processo limitado por difusão. Depois da modificação do eletrodo foi observada uma diminuição acentuada destes picos, caracterizando assim a formação da camada orientada de AMP (voltamograma vermelho). Posteriormente, foram adicionadas as ZnONps- NH_3 juntamente com EDC:NHS, onde observa-se um novo decréscimo nas respostas

amperométricas, comprovando assim a eficiente aderência das nanopartículas à superfície do eletrodo (voltamograma azul). Com a imobilização do primer da leishmania, ocorreu nova diminuição destas correntes, em decorrência à repulsão eletrostática entre o par redox e a sonda de DNA na superfície do eletrodo (voltamograma verde), comprovando assim a ligação e formação da camada sensora AMP-ZnONps-NH₃-OligLeish. Para a avaliação da ação do sistema sensor AMP-ZnONps-NH₃-OligLeish foi avaliada uma amostra contendo o DNA alvo, e após incubação foi observado o processo de hibridação, isto faz com que haja uma nova diminuição nas correntes de picos anódicos e catódicos como observado no voltamograma em rosa. Este processo reflete a presença de fitas complementares à sonda da camada sensora, demonstrando o reconhecimento específico do sensor desenvolvido. As análises foram realizadas numa faixa de potencial de -0,2 a 0,7V.

42. Através da Espectroscopia de Impedância Eletroquímica, também é possível observar o processo de modificação da superfície do eletrodo de trabalho, onde as modificações são comprovadas pelo aumento do diâmetro do semicírculo do diagrama de Nyquist, sendo este aumento relacionado ao incremento na resistência à transferência de carga (R_{CT}). O eletrodo sem modificações em sua superfície apresenta gráfico com um comportamento quase linear devido o processo ser limitado por difusão, ao adicionar o AMP à superfície do biossensor ocorre um nítido aumento do diâmetro do semicírculo quando comparado com o eletrodo sem modificação, esta característica se mantém à medida que as camadas vão sendo acrescidas ao dispositivo, refletido pelo aumento gradual de sua resistência para o sistema ZnONps-NH₃-OligLeish como para o sistema após reconhecimento ZnONps- NH₃-OligLeish-Genoma o que corrobora com as análises de voltametria cíclica. As modificações que ocorrem na superfície do eletrodo e o processo de hibridação levam a um bloqueio na transferência de elétrons do par redox ferro-ferricianeto de potássio para a superfície do eletrodo. Desta forma,

estes eventos levam a alterações no diâmetro do semicírculo visíveis no gráfico de Nyquist.

43. O processo de bioreconhecimento do biossensor frente as amostras clínicas de cães infectados (DNA) também foi analisado. Foram analisadas uma amostra concentrada (1.0ng/mL) e a mesma diluída em várias concentrações (0.5, 0.1, 0.01, 0.001 e 0.0001 ng/mL), mostrando assim a viabilidade e sensibilidade de utilização do sistema sensor (Fig. 3). Foi possível avaliar por meio das respostas dos voltamogramas cíclicos, que quanto mais concentradas as amostras, menores são as correntes de pico anódicas e catódicas, mostrando que quando aplicado o potencial sobre o eletrodo de trabalho, há um maior impedimento de passagem da corrente de elétrons

44. Referências:

Souto D.E., Silva J.V., Martins H.R., Reis A.B., Luz R.C., Kubota L.T. and Damos F.S., 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* 46:22-29 (2013).

Diniz L.M.O., Duani H., Freitas C.R., Figueiredo R.M. and Xavier C.C., Neurological involvement in visceral leishmaniasis: case report, *Rev Soc Bras Med Trop* 43:743-745 (2010).

Drummond TG, Hill MG and Barton JK, Electrochemical DNA sensors, *Nat Biotechnol* 21:1192-1199 (2003).

Xue D, Elliott CM, Gong P, Grainger DW, Bignozzi CA and Caramori S, Indirectelectrochemical sensing of DNA hybridization based on the catalytic oxidation of cobalt(II), *J Amer Chem Soc* 129:1854-1855 (2007).

Ravindranadh K and Rao MC, Physical properties and applications of conducting polymers: An Overview, *Int J Adv Pharm Biol Chem* 2:190-200 (2013).

REIVINDICAÇÕES

1 DISPOSITIVO NANOELETRÓQUÍMICO PARA DETECÇÃO DE LEISHMANIA CHAGASI BASEADO EM PARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO, caracterizado por ser um biossensor a conter as seguintes partes: a) molécula de reconhecimento (sequência de ácido nucléico), b) suporte onde será feita a imobilização das moléculas, c) fonte de corrente elétrica, d) Nanopartículas metálicas de óxido de zinco (ZnONps) e) ácido 3-mercaptopropiônico (AMP).

2 DISPOSITIVO NANOELETRÓQUÍMICO PARA DETECÇÃO DE LEISHMANIA CHAGASI BASEADO EM PARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO, de acordo com reivindicação 1, caracterizado pela detecção do analito através da análise das interações interfaciais do eletrodo.

3 DISPOSITIVO NANOELETRÓQUÍMICO PARA DETECÇÃO DE LEISHMANIA CHAGASI BASEADO EM PARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO, conforme reivindicação 1 e 2 caracterizado pela presença de nanopartículas metálicas sobre a superfície modificada com ácido 3-mercaptopropiônico obtidas através de um processo de automontagem.

4 DISPOSITIVO NANOELETRÓQUÍMICO PARA DETECÇÃO DE LEISHMANIA CHAGASI BASEADO EM PARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO, de acordo com as reivindicações 1, 2, 3 caracterizado por basear-se na aplicação de uma sonda de DNA em nanopartículas metálicas e assim permitir detecção de patógenos em amostras com baixas concentrações, em particular foi desenvolvido um genossensor para a identificação do DNA da Leishmania em amostras de pacientes infectados e cães.

5. DISPOSITIVO NANOELETROQUÍMICO PARA DETECÇÃO DE LEISHMANIA CHAGASI BASEADO EM PARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO, conforme reivindicação 1, caracterizada pelo fato da referida superfície de suporte ser de ouro o que proporciona uma maior condutividade elétrica e biocompatibilidade ao dispositivo facilitando assim a interações moleculares.

6. DISPOSITIVO NANOELETROQUÍMICO PARA DETECÇÃO DE LEISHMANIA CHAGASI BASEADO EM PARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO, conforme reivindicações 1-5, caracterizado pelo fato de que o referido compósito apresenta um núcleo formado por óxido de zinco que se liga à superfície do eletrodo de ouro devido à presença de ácido mercaptopropiônico, o qual disponibiliza grupo -COOH para interação covalente com grupo -NH_2 presentes na superfície da nanopartículas de óxido de zinco.

7. DISPOSITIVO NANOELETROQUÍMICO PARA DETECÇÃO DE LEISHMANIA CHAGASI BASEADO EM PARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO, caracterizado pela modificação camada a camada da superfície do biodispositivo seguida da análise voltamétrica e impedimétrica ao término de cada etapa de modificação e a lavagem executada com água deionizada após cada período de incubação.

8. DISPOSITIVO NANOELETROQUÍMICO PARA DETECÇÃO DE LEISHMANIA CHAGASI BASEADO EM PARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO, de acordo com as reivindicações 1, 2, 3 e 7 caracterizado pelo método de detecção eletroquímica por meio voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica.

9. DISPOSITIVO NANOELETRQUÍMICO PARA DETECÇÃO DE LEISHMANIA CHAGASI BASEADO EM PARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO, conforme reivindicação 6, caracterizado pela exposição do grupamento tiol pelo AMP.

10. DISPOSITIVO NANOELETRQUÍMICO PARA DETECÇÃO DE LEISHMANIA CHAGASI BASEADO EM PARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO, conforme reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que o grupamento tiol expostos pelo AMP é importante para a posterior ancoragem das nanopartículas.

11. DISPOSITIVO NANOELETRQUÍMICO PARA DETECÇÃO DE LEISHMANIA CHAGASI BASEADO EM PARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO, conforme reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que a sonda imobilizada na superfície da nanopartícula é uma sequência específica do material genético da *Leishmania chagasi*, proporcionando ao referido biossensor uma alta especificidade da resposta.

12. DISPOSITIVO NANOELETRQUÍMICO PARA DETECÇÃO DE LEISHMANIA CHAGASI BASEADO EM PARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO, conforme reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que a referida análise é feita numa faixa de potencial de -0.2V e 0.7 V e numa faixa de frequência de 100 mHz e 100 kHz respectivamente.

13. DISPOSITIVO NANOELETRQUÍMICO PARA DETECÇÃO DE LEISHMANIA CHAGASI BASEADO EM PARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO, caracterizado pelo uso da nanopartícula de óxido de zinco em biossensores abrangendo ao menos um agente imobilizador, no mínimo um agente ativador das ligações moleculares, para a elaboração de ferramentas para uso diagnóstico.

14. DISPOSITIVO NANOELETROQUÍMICO PARA DETECÇÃO DE LEISHMANIA CHAGASI BASEADO EM PARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO, caracterizado pelo uso da nanopartícula de óxido de zinco em biossensores, conforme reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que o referido dispositivo é um genossensor eletroquímico.

15. DISPOSITIVO NANOELETROQUÍMICO PARA DETECÇÃO DE LEISHMANIA CHAGASI BASEADO EM PARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO, caracterizado pelo uso da nanopartícula de óxido de zinco em biossensores modificados com oligonucleotídeo para elaboração de biossensores e biodispositivos.

FIGURAS

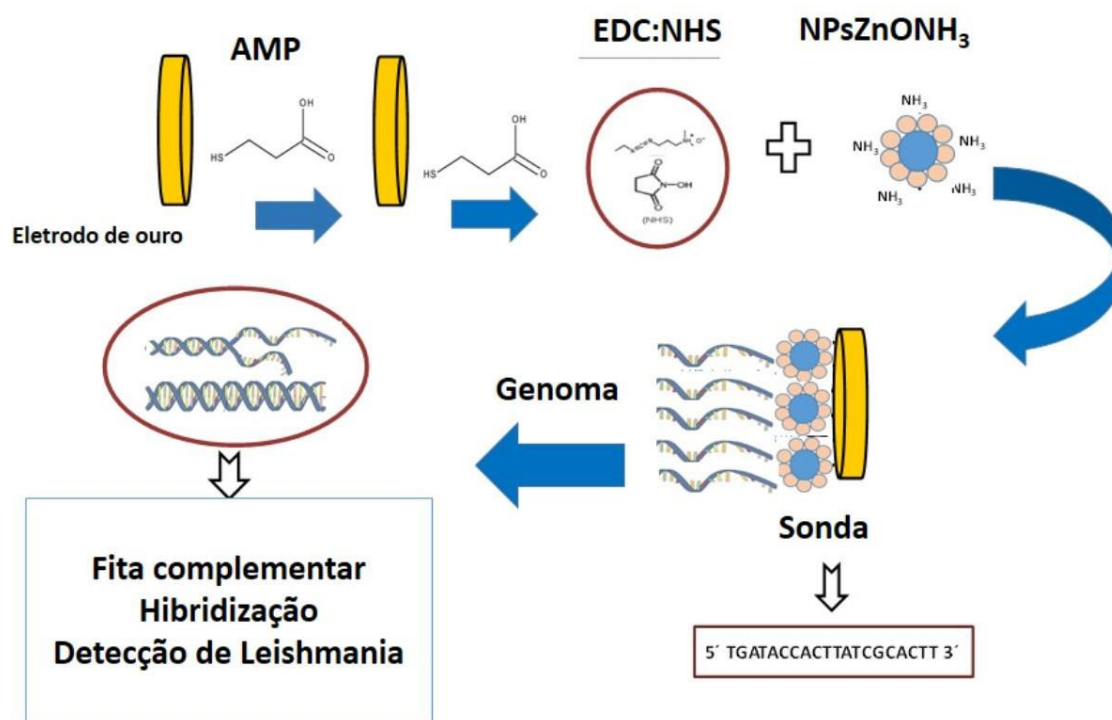


Figura 30- Representação esquemática do sistema AMP-ZnONH₃-Primer_{Leishmania}

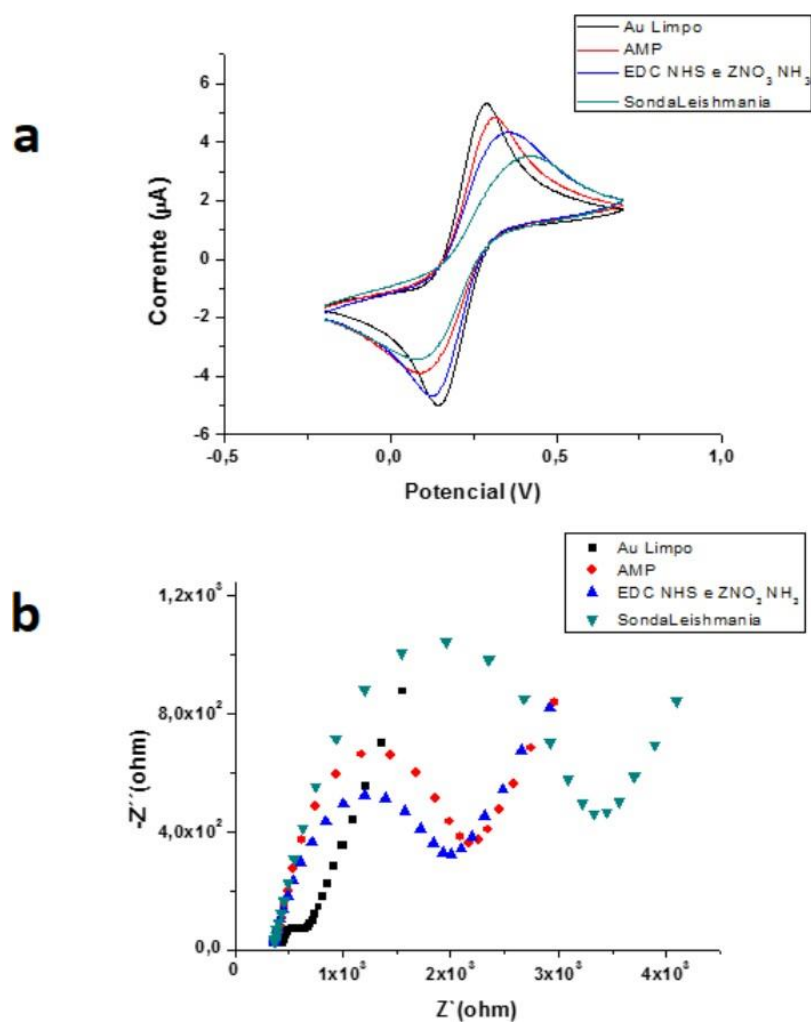


Figura 31- a) VC do sistema AMP-ZnoNH₃-Primer_{Leishmania} b) EIE do sistema AMP-ZnoNH₃-Primer_{Leishmania}

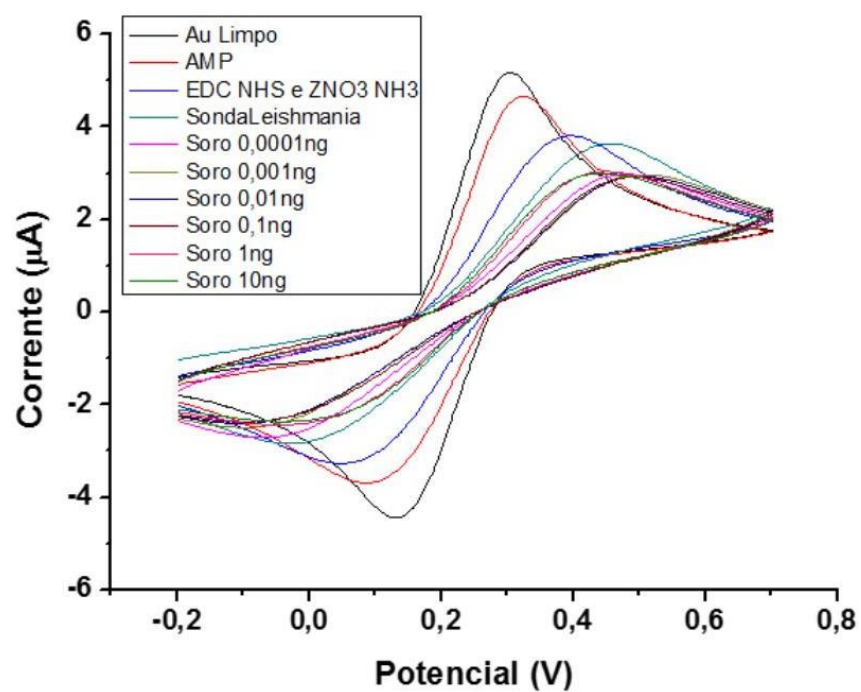


Figura 32- VC AMP-ZnONH₃-Primer_{Leishmania} quando submetido a amostra de cães contaminados

6. CONCLUSÕES

- As análises eletroquímicas realizadas indicaram a imobilização correta dos sistemas sensores $\text{NpsFe}_3\text{O}_4/\text{Quit}/\text{PANI-Primer}_{\text{Leishmania}}$ e $\text{MPA-ZnO}/\text{NH}_3\text{-Primer}_{\text{Leishmania}}$ na superfície do eletrodo de ouro por etapa de adsorção do analito.
- As análises realizadas de VC para o sistema $\text{NpsFe}_3\text{O}_4/\text{Quit}/\text{PANI-Primer}_{\text{Leishmania}}$, indicaram uma resposta satisfatória, pois em VC obteve uma transferência eletrônica satisfatória e na EIE um aumento da resposta na resistência de carga.
- As análises realizadas de VC e EIE para os sistemas $\text{MPA-ZnO}/\text{NH}_3\text{-Primer}_{\text{Leishmania}}$, indicaram uma resposta satisfatória para o sistema $\text{MPA-ZnO}/\text{NH}_3\text{-Primer}_{\text{Leishmania}}$, pois em VC obteve uma transferência eletrônica satisfatória.
- As imagens de AFM confirmam a modificação da superfície do sistema $\text{NpsFe}_3\text{O}_4/\text{Quit}/\text{PANI-Primer}_{\text{Leishmania}}$.
- Os sistemas desenvolvidos $\text{NpsFe}_3\text{O}_4/\text{Quit}/\text{PANI-Primer}_{\text{Leishmania}}$ e $\text{MPA-ZnO}/\text{NH}_3\text{-Primer}_{\text{Leishmania}}$ tem a vantagem de detecção da *Leishmania infantum* em pequenas quantidades.
- Estes resultados indicam a adequação do biossensor para aplicações práticas.

REFERÊNCIAS:

MARZOCHI, M. C. A.; COUTINHO, S. G.; SOUZA, W. J.; AMENDOEIRA, M.R. Leishmaniose Visceral (Calazar). *Jornal Brasileiro de Medicina*, v. 41, n. 5, p. 61-84, 1981.

MICHALICK, M. S. M.; GENARO, O., NEVES, D. P.; MELO, A. L.; LINARDI, P. M.;

VITOR, R. W. A. Leishmaniose visceral americana. *Parasitologia Médica*. Atheneu, São Paulo, c. 10, v. 1, p. 67-83, 2005.

LAINSON, R; SHAW, J. J.; SILVEIRA, F. T.; BRAGA, R. R.; RYAN, L; POVOA, M.

M.; et al. A Leishmania e as Leishmanioses. In: Lainson R, organizador. Instituto Evandro Chagas: 50 anos de contribuição às ciências biológicas e à medicina tropical. Serviços de saúde pública. Belém: Instituto Evandro Chagas. v. 1, p. 83- 124, 1986.

GENARO, O. Leishmaniose visceral americana. In: NEVES, D. P.; MELO, A. L.; LINARDI, P. M. *Parasitologia Humana*. Atheneu, São Paulo, c. 10, p. 56-72, 2000.

RANGEL, E. F.; LAINSON, R. Ecologia das Leishmanioses. *Lutzomyia longipalpis* e a Eco-Epidemiologia da Leishmaniose Visceral Americana (LVA) no Brasil. c. 6, p. 310-336, 2003.

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

MURRAY, H.W. et al. Advances in leishmaniasis. *Lancet*, London, v. 366, p. 1561- 1577, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana. Brasília, 2010.

VILELA, M.; MENDONÇA, S.; Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz), 2013.

SOUTO, D.E., SILVA, J.V., MARTINS, H.R., REIS, A.B., LUZ, R.C., KUBOTA, L.T.,

DAMOS, F.S. 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.

DINIZ, L.M.O., DUANI, H., FREITAS, C.R., FIGUEIREDO, R.M., XAVIER, C.C. Neurological involvement in visceral leishmaniasis: case report, *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 43 (2010) 743–745.

REIS, A.B., MARTINS-FILHO, O.A., TEXEIRA-CARVALHO, A., GIUNCHETTI, R.C., CARNEIRO, C.M., MAYRINK, W., TAFURI, W.L., CORREA-OLIVEIRA, R. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis, *Vet. Immunol. Immunopathol.* 128 (2009) 87-95.

GONTIJO, C.M.F., MELO, M.N. Visceral Leishmaniasis in Brazil: current status, challenges and prospect, *Rev. Bras. Epidemiol.* 7 (2004) 338-349.

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* 136 (2011) 2845-2851.

MUGASA, C.M., LAURENT, G.J., SCHOONE, F.L., BASIYE, A.A., SAAD, S. Schallig, Simplified molecular detection of *Leishmania* parasites in various clinical samples from patients with leishmaniasis, *Parasite Vector* 3 (2010).

DRUMMOND, T.G., HILL, M.G., BARTON, J.K. Electrochemical DNA sensors, *Nat. Biotechnol* 21 (2003) 1192-1199.

DOLEMAN, L., DAVIES, L.M., ROWE, L., MOSCHOU, E.A.
DEO, S.

Bioluminescence DNA hybridization assay for *Plasmodium falciparum* based

on the photoprotein aequorin, *Anal. Chem.* 79 (2007) 4149-4153.

ZHANG, J., SONG, S., ZHANG, L., WANG, L., WU, H., PAN, D., FAN, C.
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.

XUE, D., ELLIOTT, 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), *J. Amer. Chem. Soc.* 129 (2007) 1854-1855.

RAVINDRANADH, K., RAO, M.C. Physical properties and applications of conducting polymers: An Overview, *Int. J. Adv. Pharm. Biol. Chem.* 2 (2013) 190-200. FANG, F.F., CHOI, H.J., JOO, J. Conducting polymer/clay nanocomposites and their applications, *J. Nanosc. Nanotechnol.* 8 (2008) 1559-1581.

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

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

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. 1ª edição, 5ª reimpressão, Brasília-DF, 2014.

QUEIROZ, M.J.A., ALVES, J.G.B., CORREIA, J.B. Leishmaniose visceral: características clínico-epidemiológicas em crianças de área endêmica. J Pediatra (Rio J). 2004.

ALVES LEITE, C.E., VIDAL, S.A. Dissertação de Mestrado: Leishmaniose visceral humana em Pernambuco: epidemiologia e gastos com internações hospitalares UFPE, Recife-PE, 2016

IKEDA-GARCIA, F. A., MARCONDES, M. Métodos de diagnóstico da

leishmaniose visceral canina. Clínica Veterinária, ano XII, n. 71, p. 34-42, 2007.

Fio Cruz. IFI- Leishmaniose Humana bio-manguinhos imunofluorescência indireta para diagnóstico da Leishmaniose Humana. Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos. Ministério da Saúde. Fundação Oswaldo Cruz, 2009. Rio de Janeiro.

QUEIROZ, N. M. G. P., ASSIS, J., OLIVEIRA, T. M. F. S., MACHADO, R.Z., NUNES, C. M., BUZETTI, W. A. S. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina pelas técnicas de imunoistoquímica 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.

SCHUBACH, T. M. P. Avaliação da intradermorreação e sorologia para a leishmaniose em cães com esporotricose. Ciência Animal, Ceará, v. 11, n. 3, supl1, p. 193, 2001.

NOUGUEIRA, J.L. 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.

LOUREIRO, C.C.P. DADALTI, P., GUTIERREZ, M.C.G., SILVA. M.R. Leishmaniose: métodos diagnósticos - Folha médica 1998;117(2):131-134.

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.

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.

WANG, S.F., TAN, Y.M., Anal. Biochem.387, 703, 2014.

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.

SALGADO, A. M. 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, 2001.

DIAZ-GONZALEZ., 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.

LIU, S., LEECH, D., JU, H. *Anal. Lett.* 2003. 36,1.

CHAMBERS, J. Biosensor recognition elements. *Curr. Iss. Mol. Biol.* 2008, 10, 1-12.

RICCARDI, C.S., COSTA, P.I., YAMANAKA, H. Imunossensor amperométrico. *Quím. Nova* vol.25 n.2 São Paulo Abr./May 2002.

THEVENOT, D. R. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosensors & Bioelectronics*, v. 16, n. 1-2, p. 121-131, Jan 2001. - 36 -

LABUDA, J. Electrochemical nucleic acid-based biosensors: Concepts, terms, and methodology (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* 2010, 82(5), 1161-1187.

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.

GAUA, V. Electrochemical Molecular Analysis without Nucleic Acid Amplification. *Methods*, v.37, n.1, p.73-83, set 2005.

WANG, Y. et al. Electrochemical Sensors for Clinic Analysis. *Sensors*, v.8, p.2043- 2081, mar 2008.

GERARD, M., CHAUBEY, A., MALHORTA, B. D. *Biosens. Bioelectron.* 2002, 17, 345.

MEHRVAR, M.; ABDI, M. Recent Developments, Characteristics, and Potential Applications of Electrochemical Biosensors. *Analytical Sciences*, v.20, p.1113-1126, ago 2004.

ZHANG, J., SONG, S., ZHANG, L., WANG, L., WU, H., PAN, D., FAN, C. *J Am Chem Soc.* 128, 8575, 2006.

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.

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.

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.

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.

KARAMOLLAOĞLU, H.A.; OKTEM, M.M. QCM-based DNA biosensor for detection of genetically modified organisms (GMOs). *Biochem. Eng. J.* 2009, 44, 142-150.

MARQUES, P. R. B.O., YAMANAKA, H. Biossensores baseados no processo de inibição enzimática. *Quím. Nova* vol.31 no.7 São Paulo 2008.

QUINA, F. Nanotecnologia e o meio ambiente: perspectivas e riscos.

Quim. Nova, Vol. 27, No. 6, 1028-1029, 2004.

Cartilha sobre Nanotecnologia. Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial (ABDI), Brasília-DF, 2010.

YU, Y.Y., CHANG, S.S., LEE, C.L., WANG, C.R.C. J. Phys. Chem. B, 101, 6661, 1997.

SARGENTELLI, V., FERREIRA, A.P. Nanopartículas magnéticas: o cobalto. Eclet. Quím. vol.35 no.4 São Paulo 2010.

MEDLEY, C.D. Analytical Chemistry 2008; 80: 1067- 1072.

OLIVEIRA, M. D. L. ; ANDRADE, C. A.S. ; CORREIA, M. T.S. ; COELHO, L. C. B. B.;

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.

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.

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.

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.

SANTANA, A. T. Polímeros condutores: estudos e utilização de polímeros condutores. Centro Universitário Estadual da Zona Oeste. Rio de Janeiro, 2012.

AKIRA, I. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2005; 100: 1-11.

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.

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

BRETT, C. M. A.; BRETT, A. M. O., Electrochemistry: Principles, Methods, and Applications, Oxford, 1993.

CARMO, D. R., SILVA, R. M., STRADIOTTO, N. R. Estudo eletroquímico de $\text{Fe}[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]$ em eletrodo de pasta de grafite. Eclet. Quím. vol.27 no.special São Paulo 2014.

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. 2014.

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.

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.

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, 2013.

DEDAVID, B. A., GOMES, C. I., MACHADO, G. *Microscopia Eletrônica de Varredura*. PUCRS, Porto Alegre, 2012.

CASTRO, L. A. S. *Processamento de Amostras para Microscopia Eletrônica de Varredura*. Embrapa, Pelotas, RS, 2016

MELO, C. P., SANTOS, C. G., ANDRADE, C. A. S. US Patent PCT/BR2009/000117, 2009.

OLIVEIRA, M. D. L. Tese de Doutorado. Estudo bioeletroquímico de nanosistemas 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.

OLIVEIRA, I. R. W. Z., VIEIRA, I.C. Construção e aplicação de biossensores usando diferentes procedimentos de imobilização da peroxidase de vegetal em matriz de quitosana. *Quim. Nova*, Vol. 29, No. 5, 932-939, 2006.

DEVI, R., PUNDIR, C.S. Construction and application of an amperometric uric acid biosensor based on covalent immobilization of uricase on iron oxide nanoparticles/chitosan-g-polyaniline composite film electrodeposited on Pt electrode. *Sensors and Actuators B* 193 (2014) 608– 615.

GARCIA, M.F.K.S. Dissertação de Mestrado: Desenvolvimento de plataforma nanoestruturada para biodeteção de *Leishmania infantum*. Universidade Federal de Pernambuco- UFPE, Recife-PE, 2015.

COSTA, M.P. Dissertação de Mestrado: Desenvolvimento de biossensor impedimétrico para detecção de mycobacterium tuberculosis baseado em ácido mercaptobenzóico (amb) e nanopartículas magnéticas. Universidade Federal de Pernambuco- UFPE, Recife-PE, 2014.

SANTOS, G.S. Dissertação de Mestrado: Desenvolvimento de biossensor impedimétrico para detecção de *Schistosoma mansoni* baseado em nanocompósito de óxido de ferro e ouro. Universidade Federal de Pernambuco- UFPE, Recife-PE, 2016.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. Princípios de Análise Instrumental. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002..

SHI A, WANG J, HAN X, FANG X, ZHANG Y. A sensitive electrochemical DNA biosensor based on gold nanomaterial and graphene amplified signal. Sensors Actuators, B Chem [Internet]. Elsevier B.V.; 2014;200:206–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2014.04.024>

SILVA, B. V. M.; CAVALCANTI, I. T.; MATTOS, A. B.; MOURA, P.; SOTOMAYOR, M.

D. P. T.; DUTRA, R. F. Disposable immunosensor for human cardiac troponin T based on streptavidin-microsphere modified screen-printed electrode. Biosens. Bioelectron., 26, 1062–1067, 2010.

STEVANATTO, L. C.; BRUSAMARELLO, V. J.; TAIROV, S. Parameter

identification and analysis of uncertainties in measurements of lead-acid batteries. IEEE trans. Instrum. Meas. Vol 63, no. 4, pp 761-768. 2014.

SINGH, M.; VERMA, N.; GARG, A.K.; REDHU, N.; (2008). Urea Biosensors – Review. Sensors and Actuators B: Chem., doi:10.1016/j.snb.2008.

SONG, S.; XU, H.; FAN, C. Potential Diagnostic Applications of Biosensors: Current and Future Directions. International Journal of Nanomedicine, v.1, n.4, p.433-440, 2006.

SOUZA, F.A; SANTOS, I. Disseminação da Esquistossomose Mansônica na Região de Santa Cruz das Palmeiras-SP. Rev. LOGOS, 16 p.43, 2008.

STOTHARD, J.R., SOUSA-FIGUEIREDO, J.C., STANDLEY, C., VAN DAM, G.J., KNOPP, S., UTZINGER, J., AMERI, H., KHAMIS, A.N., KHAMIS, I.S., DEELDER, A.M., MOHAMMED, K.A., ROLLINSON, D., An evaluation of urine-CCA strip test and fingerprick blood SEA-ELISA for detection of urinary schistosomiasis in schoolchildren in Zanzibar. Acta Trop. 111. 2014.

SUÁREZ, G., SANTSCHI, C., MARTIN, O.J.F., SLAVEYKOVA, V.I., Biosensor based on chemically-designed anchorable cytochrome c for the detection of H₂O₂ released by aquatic cells. Biosens. Bioelectron. 42 (0), 2013.

TAN, S.T.; WENDORFF, J.H.; PIETZONKA, C.; JIA, Z.H.; WANG, G.Q. Biocompatible and biodegradable polymer nanofibers displaying superparamagnetic properties. Chem. Phys. Chem. 6 (2005) 1461–1465.

WANG, J. From DNA Biosensors to Gene Chips. *Nucleic Acids Research*. 2000. v.28, n.16, p.3011-3016.

WANG, M.; SUN, C.; WANG, L.; JI, X.; BAI, Y.; LI, T.; LI, J. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 33 (2003) 1117

WANG, J.; ZHANG, S.; ZHAN, Y. *Anal. Biochem.* 396 (2010) 304. 67 WANG S, YIN

T, ZENG S, CHE H, YANG F, et al. A Piezoelectric Immunosensor Using Hybrid Self- Assembled Monolayers for Detection of *Schistosoma japonicum*. (2012) *PLoS ONE* 7(1): e30779

WANG, Y.; ZHOU, A. Spectroscopic studies on the binding of methylene blue with DNA by means of cyclodextrin supramolecular systems. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, v. 190, n. 1, p. 121-127, July 2006.

LIMA, A.S., BERTOTTI, M. Development of non-enzymatic and highly selective hydrogen peroxide sensor based on nanoporous gold prepared by a simple unusual electrochemical approach. *Microchemical Journal* 133 (2017).

MELONI, G.N., BERTOTTI, M. Ring-disc Microelectrodes towards Glutathione Electrochemical Detection. *Electroanalysis* 29 (2017).

CARNEIRO, J. F., TREVELIN, L. C., LIMA, A. S., MELONI, G. N., BERTOTTI, M.,

HAMMER, P., BERTAZZOLI, R., LANZA, M. R. V. Synthesis and Characterization of ZrO₂/C as Electrocatalyst for Oxygen Reduction to

H₂O₂. *Electrocatalysis* 8 (2017) 189 – 195

CASTRO, P. S., BERTOTTI, M., NAVES, A. F., CATALINI, L. H., CORNEJO, D. R.,

BLOISI, G. D., PETRI, F.S. Hybrid magnetic scaffolds: The role of scaffolds charge on the cell proliferation and Ca²⁺ ions permeation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 156 (2017) 388 – 396.

GONÇALVES, J. M., GUIMARÃES, R. R., BRANDÃO, B. B.N.S., SARAIVA, L. P.H.

ROSSINI, P. O., NUNES, C. V., Nanostructured Alpha-NiCe Mixed Hydroxide for Highly Sensitive Amperometric Prednisone Sensors. *Electrochimica Acta* 247 (2017).

SANTOS, C. S., KOWALTOWSKI, A. J., BERTOTTI, M. Single Cell Oxygen Mapping (SCOM) by Scanning Electrochemical Microscopy Uncovers Heterogeneous Intracellular Oxygen Consumption. *Scientific Reports* 7 (2017) 11428 – 11434

MELONI, G.N., BERTOTTI, M. 3D printing scanning electron microscopy sample holders: A quick and cost effective alternative for custom holder fabrication. *PLoS One* 12 (2017) e0182000

SIDDIQUEE, S., ROVINA, K. YUSOF, N.A., RODRIGUES, K.F. Nanoparticle-enhanced electrochemical biosensor with DNA immobilization and hybridization of *Trichoderma harzianum* gene. *Sensing and Bio-Sensing Research* 2 (2014) 16–22.

PUNDIR, C.S., DEVI, R. Construction and application of an amperometric

uric acid biosensorbased on covalent immobilization of uricase on iron oxide nanoparticles/chitosan-g-polyaniline composite film electrodeposited on Pt electrode. *Sensors and Actuators B* 193 (2014) 608– 615.

GRASSET, F., SAITO, N., LI, D. Surface modification of zinc oxide nanoparticles by aminopropyltriethoxysilane. *Journal of Alloys and Compounds* 360 (2003) 298.