



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DA REDE NORDESTE DE
BIOTECNOLOGIA

DJAIR DE LIMA FERREIRA JUNIOR

**DESENVOLVIMENTO DE TESTE RÁPIDO PARA LEISHMANIOSE VISCERAL
CANINA UTILIZANDO IMUNOSSENSOR NANOESTRUTURADO BASEADO EM
ANTÍGENOS RECOMBINANTES**

Recife

2017

DJAIR DE LIMA FERREIRA JUNIOR

**DESENVOLVIMENTO DE TESTE RÁPIDO PARA LEISHMANIOSE VISCERAL
CANINA UTILIZANDO IMUNOSSENSOR NANOESTRUTURADO BASEADO EM
ANTÍGENOS RECOMBINANTES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia em Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Rosa Amália Fireman Dutra.

Recife

2017

Catálogo na Fonte:
Bibliotecária Natália Nascimento, CRB4/1743

Ferreira Junior, Djair de Lima.

Desenvolvimento de teste rápido para leishmaniose visceral canina utilizando imunossensor nanoestruturado baseado em antígenos recombinantes. / Djair de Lima Ferreira Junior. – 2017

58 f. : il., fig.; tab.

Orientadora: Rosa Amália Fireman Dutra.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biotecnologia. Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da rede nordeste de biotecnologia, Recife, 2017.
Inclui referências.

1. Teste rápido. 2. Nanossensor. 3. Leishmaniose. 4. Eletroquímica - eletrodo impresso. I. Dutra, Rosa Amália Fireman. (orient.). II. Título.

587

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2023-016

DJAIR DE LIMA FERREIRA JUNIOR

**DESENVOLVIMENTO DE TESTE RÁPIDO PARA LEISHMANIOSE VISCERAL
CANINA UTILIZANDO IMUNOSSENSOR NANOESTRUTURADO BASEADO EM
ANTÍGENOS RECOMBINANTES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Tecnologia e Geociências, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia em Saúde

Aprovada em: 07/02/2017.

BANCA EXAMINADORA

Profª. Dra. Rosa Amália Fireman Dutra (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Rogério Tavares Ribeiro (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Profª. Dra. Beate Saegesser Santos (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Profª. Dra. Maria Izabel Florindo Guedes (Examinadora Externa)
Universidade Estadual do Ceará

A Deus, motivo e origem de tudo...

Aos meus pais Djair e Socorro (Tuta e Côca), que moldaram meu caráter... de onde se origina toda minha essência...

Dedico...

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder perseverança e por guiar meus passos por meio da espiritualidade superior e do meu anjo guardião.

À Profa. Rosa Fireman Dutra, pela oportunidade dada, pela confiança e pela simplicidade que tornou a convivência leve e favorável ao desenvolvimento das ideias.

Aos amigos Erika Lima, Diego Guerra, Diego Augusto, Ana Carolina, Cybelle, Rogério, Paulo Landim, Joilson Ramos, Mizia Sabóia, Priscila, por tornarem mais leves as horas dedicadas ao trabalho árduo dos experimentos de uma tese.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

Aos professores e funcionários da RENORBIO, que contribuíram para o desenvolvimento deste doutorado.

RESUMO

A leishmaniose é um importante problema de saúde pública em pelo menos 88 países, representando uma importante causa de morbidade e mortalidade no Brasil para seres humanos e cães. Os imunossensores são dispositivos bioanalíticos que convertem em sinal elétrico a resposta da interação antígeno-anticorpo. Comparados às técnicas imunossorológicas convencionais, os dispositivos têm como vantagem a praticidade, a possível portabilidade, o menor custo e tempo de análise. Neste projeto, foram empregadas as técnicas de voltametria cíclica e de onda quadrada para detectar a resposta da reação antígeno-anticorpo. Utilizou-se a tecnologia de eletrodos impressos (screen-printed electrodes), a qual apresenta facilidade de produção em larga escala, miniaturização e baixo custo. Visando uma maior estabilidade da matriz de imobilização do imunossensor, foram utilizadas monocamadas auto-organizadas (SAM) de alcanotóis, às quais foram ancorados nanotubos de carbono (NTCs), conferindo ao sensor um incremento na sensibilidade e consequente imobilização de biomoléculas. Utilizou-se os antígenos recombinantes rLci2B-NH6, os quais demonstraram alta especificidade quando testados em ensaios sorológicos para leishmaniose visceral (patente PI0900961-2A2BR). A matriz sensora composta pela cisteamina e NTC mostrou-se estável quando submetida a diferentes velocidades de varredura (30 a 180 mV s⁻¹), ocorrendo transferência de carga reversivelmente em presença de sonda redox. Além disso, quando a matriz sensora foi submetida a 20 ciclos de voltametria cíclica (na janela de potencial de -0,8 a 0,8 V e sob velocidade de varredura de 30 a 180 mV s⁻¹), esta apresentou boa reprodutibilidade com um coeficiente de variação de 3,02%, correspondente à amplitude dos picos redox. Os resultados analíticos frente ao soro canino positivo para *Leishmania infantum* mostrou variação de amplitude de corrente anódica quatro vezes superior ao soro controle (soro negativo), respostas geradas pela técnica de voltametria de onda quadrada. O desenvolvimento deste imunossensor promove avanços significativos na identificação precisa do parasita nos cães, aumentando as chances de diagnóstico precoce, o que possibilita o controle da doença através da ruptura da cadeia de transmissão.

Palavras-chave: Teste rápido; Nanossensor; Leishmaniose; Eletroquímico; Eletrodo impresso.

ABSTRACT

Leishmaniasis is an important public health problem in at least 88 countries, representing a major cause of morbidity and mortality in Brazil for humans and dogs. Immunosensors are bioanalytical devices that convert the antigen-antibody interaction response into an electrical signal. Compared with conventional immunoserological techniques, the devices have the advantage of practicality, portability, lower cost and time of analysis. In this project, the techniques of cyclic and square wave voltammetry were used to detect the response of the antigen-antibody reaction. Screen-printed electrodes (SPEs) technology, which has a large-scale production facility, miniaturization and low cost, was used. Aiming for greater stability of the immobilization matrix of the immunosensor, self-assembled monolayers (SAM) of alkanethiols were used, to which carbon nanotubes (CNTs) were anchored, giving the sensor an increase in the sensitivity and consequent immobilization of biomolecules. rLci2B-NH6 recombinant antigens were used, which demonstrated high specificity when tested in serological tests for visceral leishmaniasis (patent PI0900961-2A2BR). The sensor matrix composed of cysteamine and CNTs was stable when submitted to different scan rate (30 to 180 mV s⁻¹), with reversible charge transfer in the presence of redox probe. In addition, when the sensor matrix was subjected to 20 cycles of cyclic voltammetry (at potential range from -0.8 to 0.8 V and 30 to 180 mV s⁻¹ scan rate), it presented good reproducibility with a coefficient of variation of 3.02%, corresponding to the amplitude of the redox peaks. The analytical results against the canine serum positive for *Leishmania infantum* showed a variation of anodic current amplitude four times higher than the control serum (negative serum), responses generated by the square wave voltammetry technique. The development of this immunosensor promotes significant advances in the precise identification of the parasite in dogs, increasing the chances of early diagnosis, which makes possible the control of the disease through the rupture of the transmission chain.

Keywords: Quick test; Nanosensor; Leishmaniasis; Electrochemical; Screen-printed electrode.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ciclo evolutivo da <i>Leishmania</i>	16
Figura 2 – Comparação entre taxa de incidência de casos e óbitos de leishmaniose visceral humana no Brasil, no período compreendido entre os anos de 2001 e 2014.	17
Figura 3 – Casos de leishmaniose visceral humana confirmados laboratorialmente no período de 2001 a 2014.....	18
Figura 4 – Representação esquemática de um biossensor, mostrando a organização dos seus componentes funcionais. A detecção do analito-alvo é feita por um componente biológico que gera um sinal (A), o qual é convertido (B) e processado (C).	24
Figura 5 – Representação esquemática da imobilização de anticorpos de forma aleatória e orientada.....	28
Figura 6 – Desenho esquemático dos diferentes tipos de nanotubos de carbono multi-walled (A) e single-walled (B). Os diâmetros médios para os nanotubos do tipo multi-walled variam de 10 a 100 nm e do tipo single-walled variam de 2 a 50 nm.	30
Figura 7 – Voltametria cíclica: (a) Sinal de excitação para a voltametria cíclica e, (b) Voltamograma cíclico para um processo redox reversível.....	32
Figura 8 – Forma de aplicação do potencial na voltametria de onda quadrada.	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFM	Microscopia de força atômica, do inglês <i>Atomic Force Microscopy</i>
CDR	Regiões Determinantes de Complementaridade
CNTs	Nanotubos de carbono, do inglês <i>Carbon Nanotubes</i>
CV	Voltametria Cíclica, do inglês <i>Cyclic Voltammetry</i>
DAT	Teste de Aglutinação em gota
DPV	Voltametria de pulso diferencial, do inglês <i>Differential Pulse Voltammetry</i>
EDC	<i>N</i> -etil- <i>N</i> -(dimetilaminopropil) carbodiimida
ELISA	Ensaio imunoadsorvente ligado à enzima, do inglês <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FT-IR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier, do inglês <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>
Ig	Imunoglobulina
INPI	Instituto Nacional da Propriedade Industrial
I _{pa}	Corrente de pico anódico
I _{pc}	Corrente de pico catódico
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LV	Leishmaniose Visceral
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
MWCNT	Nanotubos de carbono de múltiplas paredes, do inglês <i>Multi-Walled Carbon Nanotubes</i>
NHS	<i>N</i> -hidroxi-succinamida
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
QCMB	Microbalança de Cristal de Quartzo
RFC	Reação de Fixação de Complemento
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
SAM	Monocamadas auto-organizadas, do inglês <i>Self-assembled monolayer</i>
SEM	Microscopia eletrônica de varredura, do inglês <i>Scanning Electron Microscopy</i>
SPE	Eletrodos impressos, do inglês <i>Screen-Printed Electrodes</i>
SWCNT	Nanotubos de carbono de parede simples, do inglês <i>Single-Walled Carbon Nanotubes</i>

SWV	Voltametria de Onda Quadrada, do inglês <i>Square Wave Voltammetry</i>
ω	Frequência μm (Micrômetros)
ΔE_s	Incremento de varredura de potenciais
t	período

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	DIAGNÓSTICO DA LV.....	20
2.2	ANTÍGENOS RECOMBINANTES	21
2.3	BIOSSENSORES	22
2.3.1	Eletrodos impressos	26
2.3.2	Imunossensores	26
2.3.3	Imobilização de anticorpos	27
2.3.4	Nanotubos de carbono	29
2.3.5	Medidas eletroquímicas	31
2.3.5.1	Voltametria cíclica	31
2.3.5.2	Voltametria de onda quadrada.....	33
2.4	ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER.....	35
3	OBJETIVOS	37
3.1	OBJETIVO GERAL.....	37
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
4	PATENTE	38
4.1	PROTOCOLO DE DEPÓSITO DE PEDIDO DE PATENTE	38
4.2	DESCRIÇÃO DA PATENTE.....	39
5	CONCLUSÃO	50
	REFERÊNCIAS	51

1 INTRODUÇÃO

Desde o início dos anos 1980, a leishmaniose visceral (LV), que é, em geral, uma doença zoonótica rural, se espalhou para os centros urbanos do norte, sul e oeste do Brasil (HARHAY et al., 2011). A LV é uma doença parasitária potencialmente fatal dos trópicos e sub-trópicos, causada por membros do complexo *Leishmania donovani*, na África Oriental e no subcontinente indiano e *Leishmania infantum* na Europa, Norte da África e América Latina. Estima-se que 0,5 milhões de novos casos são relatados, e mais de 50.000 mortes ocorrem devido à LV a cada ano (DESJEUX, 2004). Com o aumento da incidência de resistência à droga utilizada no tratamento da LV em áreas endêmicas, a detecção de casos de forma precoce e precisa propicia um tratamento eficaz e implica em uma importante medida a ser adotada no controle de LV (CHAPPUIS et al., 2007; MONDAL; BHATTACHARYA; ALI, 2010; SRIVASTAVA et al., 2011).

Dentre as dificuldades encontradas no enfrentamento dessa doença, durante a realização de inquéritos epidemiológicos, encontra-se o lapso de tempo importante entre a coleta de amostra clínica nos animais em campo e o fechamento de diagnóstico laboratorial. Muitas vezes ao voltar para recolher o cão contaminado para realização de eutanásia, este não mais se encontra no domicílio anteriormente registrado. Desta forma, esses animais positivos permanecem como importantes fontes de infecção para o vetor e desse para o ser humano e outros animais, continuam sendo importante fonte de contaminação para a disseminação da doença. Inquéritos epidemiológicos baseados no diagnóstico laboratorial, em populações humanas e caninas sob risco de transmissão, são necessários para avaliar a extensão do problema. Os profissionais e pesquisadores se esbarram na escolha de um método apropriado, simples, sensível e específico, que possibilite o diagnóstico não apenas dos casos avançados, mas também dos iniciais, oligossintomáticos e assintomáticos. A partir de trabalhos de pesquisadores brasileiros, como Chagas, Deane e Deane e Alencar, demonstrando a importância dos cães na transmissão da LV, os estudos sorológicos de cães infectados vêm aumentando. Visando a obtenção de melhores resultados e métodos diagnósticos que facilitem a realização de inquéritos epidemiológicos, assim como melhor conhecimento da distribuição geográfica, cientistas vêm desenvolvendo técnicas cada vez mais sensíveis, específicas e de fácil execução (ALVEZ; BEVILACQUA, 2004).

Um diagnóstico preciso para orientar o tratamento da LV é o primeiro passo para se promover o controle desta doença. Até recentemente, o diagnóstico da LV era complexo e invasivo (exame microscópico direto do baço, gânglios linfáticos, ou aspirado de medula

óssea). Os avanços tecnológicos têm levado a melhorias significativas no desenvolvimento de novas ferramentas de diagnóstico que são úteis na detecção das doenças, permitindo assim o desenvolvimento de estratégias racionais de controle (BOELAERT et al., 2008).

Os métodos sorológicos utilizados para diagnóstico de LV baseiam-se na identificação de anticorpos nos soros de doentes com LV. Antígenos recombinantes melhoraram consideravelmente a sensibilidade e especificidade do diagnóstico imunológico destinado à detecção de antígenos presentes em amostras de sangue total (HARHAY et al., 2011).

Na atualidade, diagnósticos clínicos e monitoramentos requerem análises rápidas e precisas. O custo para produzir dispositivos analíticos e o custo por teste representam importantes fatores que implicam no desenvolvimento de novas tecnologias diagnósticas. Além disso, deve-se levar em consideração a necessidade de pessoal qualificado para a execução de tais análises, o que aponta para a necessidade de tecnologias de análise alternativas, de fácil execução e baixo custo. Os biossensores representam uma alternativa viável na resolução dos problemas apresentados anteriormente, ou pelo menos podem representar uma ferramenta útil (RECHNITZ, 1987; RECHNITZ; NAKAMURA, 1988). Kissinger (2005) definiu biossensor como um dispositivo no qual um elemento de reconhecimento biológico é construído e fisicamente ligado ou imobilizado, com elemento de seletividade primária. Muitos sensores utilizados para fins biológicos não são, portanto, biossensores, incluindo aqueles para a temperatura, pressão, electrocardiogramas, pH, Ca^{2+} , catecolaminas e similares (KISSINGER, 2005). Como um sistema de biorreconhecimento, uma enzima, anticorpo, DNA, microrganismo, entre outros, podem ser usados. Estes são capazes de reconhecer seus analitos específicos e também regulam a especificidade e a sensibilidade do dispositivo. Numerosas técnicas de imobilização, tais como ligação covalente, adsorção física, reticulação, encapsulamento e aprisionamento, têm sido empregadas para a estabilização de enzimas ou outros componentes em superfícies ou plataformas para o desenvolvimento de biossensores (MALHOTRA; CHAUBEY, 2003). Os biossensores existentes hoje em dia utilizam vários tipos de transdutores para converter a energia produzida na reação bioquímica, resultante da interação entre a molécula do analito e o biorreceptor em um sinal mensurável. Estes são principalmente eletroquímicos, incluindo amperométricos, condutimétricos e potenciométricos. O princípio básico para esta classe de biossensores é que as reações químicas entre biomoléculas imobilizadas e os analitos produtos-alvo consomem íons ou elétrons que causam alguma alteração nas propriedades elétricas mensuráveis da solução, tais como corrente elétrica, condutividade, potencial e força iônica (VELASCO-GARCIA, 2009).

Inúmeros biossensores têm sido desenvolvidos para detecção de anticorpos ou antígenos circulantes para diferentes doenças, tais como malária, dengue (CAVALCANTI et al., 2012; DIAS et al., 2013), hepatite, infarto do miocárdio (SILVA et al., 2010) e leishmaniose (RAMOS-JESUS et al., 2011), destacando-se o biossensor piezoelétrico desenvolvido por Ramos e colaboradores para detectar anticorpos de *Leishmania chagasi*. Entretanto, estes têm a desvantagem de precisar de equipamento que dificulta sua utilização em campo.

Uma das perspectivas de transdutores eletroquímicos para imunossaios de mono uso pode ser alcançada através da tecnologia de eletrodos impressos (SPEs, do inglês *Screen-Printed Electrodes*). Estes dispositivos oferecem diversas vantagens, tais como facilidade de miniaturização, menor custo e compatibilidade com as tecnologias de produção em larga escala de sensores. O princípio de confecção dos SPEs é baseado na impressão de tintas condutoras sobre um suporte inerte cerâmico ou plástico (FANJUL-BOLADO et al., 2007; TALEAT; KHOSHROO; MAZLOUM-ARDAKANI, 2014). A facilidade em imprimir eletrodos com áreas e espessuras diferentes, aliada à simplicidade para incorporação de elementos modificadores, que promovam o aumento na condutividade, área superficial e transferência de elétrons, tem destacado esta tecnologia como uma das mais vantajosas para elaboração de testes de triagem e à beira do leito. Aliada a isso, a incorporação de nanomateriais de carbono, tais como nanotubos de carbono (CNTs, do inglês *Carbon Nanotubes*) e grafeno (GR, do inglês *Graphene*) tem guiado o desenvolvimento de novas estratégias para confecção de eletrodos com características eletroanalíticas mais aprimoradas, tais como alta área superficial, excelente condutividade elétrica e versatilidade para funcionalização com diferentes grupos proteína-reativos.

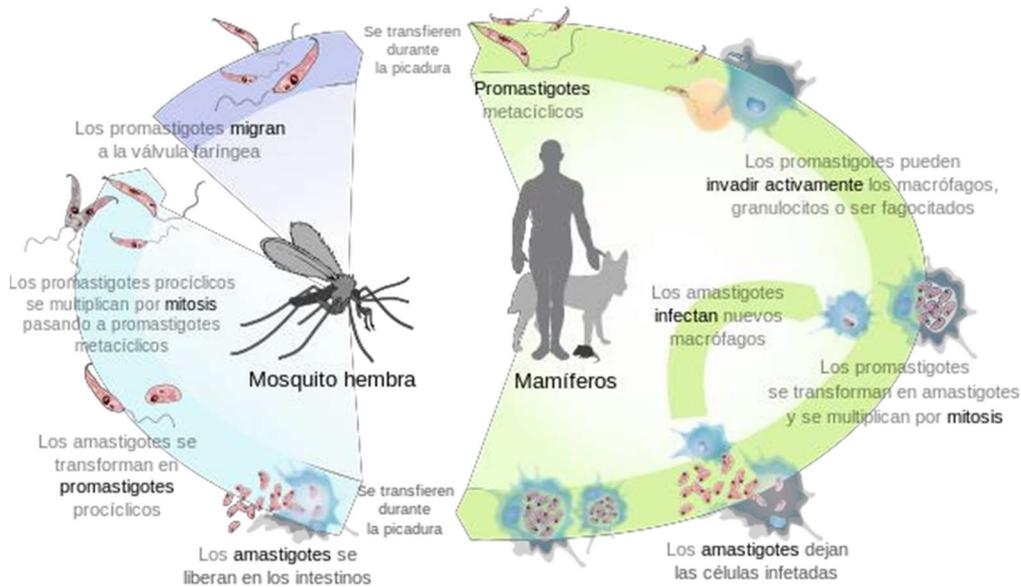
Pelos motivos expostos, esta tese relata o desenvolvimento de imunossensor eletroquímico, utilizando antígenos recombinantes de *Leishmania chagasi* imobilizados sobre uma matriz de cisteamina e nanotubos de carbono, destinado ao diagnóstico de Leishmaniose Visceral Canina.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Leishmanioses são infecções causadas por protozoários parasitos intracelulares obrigatórios pertencentes à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania*. Eles configuram um quadro clínico e epidemiológico vasto, englobando inúmeras espécies de *Leishmania* que podem infectar o ser humano, entre outros mamíferos hospedeiros, de acordo com o seu ciclo de infestação (Figura 1). Particularmente no Brasil, são relatados entre 2000 e 3000 casos por ano (QUINNELL; COURTENAY, 2009). Aqui, as leishmanioses estão incluídas no Sistema Nacional de Informação de Doenças de Notificação Compulsória do Ministério da Saúde, com registros de casos em todas as Unidades Federadas, afetando principalmente as populações mais pobres. A LV ganha cada vez mais destaque por causa da sua frequência de ocorrência e sua capacidade de se espalhar rapidamente, sendo o parasita transmitido a partir de animais aos vetores e depois, a partir deles para seres humanos (WHO, 2010).

A LV é um sério problema de saúde pública com ampla distribuição mundial. Dentre as formas em que se apresenta, a *Leishmania* destaca-se pela sua capacidade de invadir as vísceras do hospedeiro. Há diferentes espécies de *Leishmania* com a capacidade de causar calazar, *L. donovani* (encontrada com maior frequência na Índia e Ásia), *L. infantum* (mais encontrada na região do Mediterrâneo, Oriente Médio e Ásia) e *L. chagasi* (encontrada na América do Sul), estas possuem atração pelas vísceras da cavidade abdominal dos indivíduos humanos, causando lesões em baço, fígado e medula óssea (LOMBARDI et al., 2014).

Figura 1 – Ciclo evolutivo da *Leishmania*.



Fonte: Ministério da Saúde (2015).

Atualmente, a LV encontra-se entre as sete endemias consideradas prioritárias das ações de saúde no mundo, estando incluída na lista de doenças tropicais negligenciadas, que deveriam ser eliminadas até 2015, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) (MICHALSKY et al., 2009).

O Brasil é responsável por 90% dos casos de LV registrados na América Latina, sendo considerado o terceiro país com maior ocorrência no mundo (BERN; MAGUIRE; ALVAR, 2008). No Brasil, entre 1999 e 2008, mais de 1/3 dos municípios brasileiros notificaram casos autóctones, nos quais permanece como mais uma doença negligenciada. De 1980 a 2008, foram notificados mais de 70 mil casos de LV no país, levando mais de 3.800 pessoas à morte (BARRETO et al., 2011; WERNECK, 2010).

Nas últimas quatro décadas, o desenvolvimento econômico do Brasil concorreu para alterar as interações entre homem, ambiente e processos biológicos (ALVES et al., 2013). O perfil epidemiológico do território nacional (MACHADO, 2012) foi redesenhado pelo estabelecimento de um quadro endêmico de leishmaniose (DUJARDIN, 2005; MAIA; CAMPINO, 2011), sobretudo, a visceral, uma zoonose transmitida por vetor de importância mundial (CLABORN, 2014), que envolve os cães como reservatórios, i.e., espécies animais das quais um parasita depende para sua sobrevivência (FAUSTO; BEAVER; JUNG, 1973). A dispersão espaço-temporal dessa e de outras doenças infecto-parasitárias, como a malária, a dengue e a hantavirose, acompanha o rápido crescimento de megacidades com um alto fluxo populacional, o aumento da pobreza, as baixas condições sanitárias, o deslocamento do

reservatório doméstico e a adaptação das espécies vetoras, entre outros fatores de risco (CLABORN, 2014). Tais características são propícias à expansão e à adaptação de um patógeno a um novo nicho, em diferentes escalas, desde a local, passando pela regional e nacional, até a global (ALVES et al., 2013). Uma vez que as zoonoses podem ser definidas como processos em fluxo (ALVES et al., 2013), as mudanças ambientais colocam-se, sem dúvida, entre as mais importantes forças motrizes para a emergência e reemergência dessas doenças (ASHFORD, 1996; FAUSTO; BEAVER; JUNG, 1973; WHO, 2010), que contam ainda com mudanças no uso da terra, mudanças climáticas, condições socioeconômicas e perda de biodiversidade como matrizes impulsionadoras à disseminação espaço-temporal dessas enfermidades, tanto nas populações humanas, como nos animais. Contudo, para além dos aspectos de natureza ecológica, processos de natureza política, jurídica e institucional também operam como forças motrizes de uma dinâmica com características transnacionais (MACHADO, 2012, 2014).

A LV ganha cada vez mais destaque por causa da sua frequência de ocorrência e sua capacidade de se espalhar rapidamente, sendo o parasita transmitido a partir de animais aos vetores e depois, a partir deles, para seres humanos (WHO, 2010).

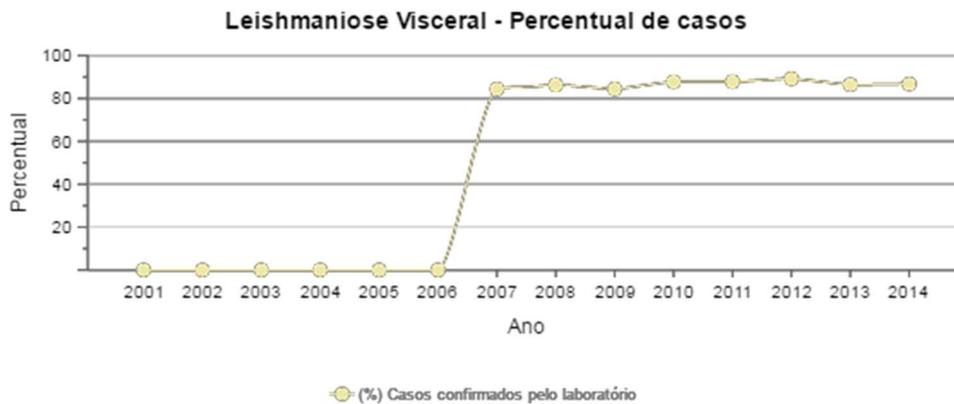
De acordo com os dados do Ministério da Saúde, a taxa de morbidade por LV vem diminuindo, no entanto, o número de casos com confirmação laboratorial ainda se mantém crescendo desde 2007 (Figuras 2 e 3).

Figura 2 – Comparação entre taxa de incidência de casos e óbitos de leishmaniose visceral humana no Brasil, no período compreendido entre os anos de 2001 e 2014.



Fonte: Ministério da Saúde (2015).

Figura 3 – Casos de leishmaniose visceral humana confirmados laboratorialmente no período de 2001 a 2014.



Fonte: Ministério da Saúde (2015).

A principal forma de transmissão dessa doença ocorre quando uma fêmea infectada de flebotomíneo passa o protozoário a uma vítima sem a infecção, enquanto se alimenta de seu sangue, como foi apresentado na Figura 1 e pode manifestar-se clinicamente de três formas (cutânea, muco cutânea, e visceral) dependendo da espécie do parasita. Também conhecida como Kalazar, a forma visceral representa a mais severa, com alta mortalidade, se não tratada adequadamente. Nas Américas, assim como em áreas do Mediterrâneo, Oriente Médio, África Ocidental e Ásia Central, a LV é causada pela *Leishmania infantum* (anteriormente, *Leishmania chagasi*) e é uma doença zoonótica, com um reservatório animal e infecções humanas ocasionais. Em comparação, LV na Índia e África (causada por *Leishmania donovani*) é transmitida entre humanos. Estas diferenças têm profundas implicações quanto ao controle da transmissão. No Brasil e em outros ambientes com transmissão zoonótica para LV, a principal causa da continuidade das infecções em humanos são os animais infectados que se mantêm como importantes reservatórios. Em menor escala, *Leishmania infantum* também pode ser transmitida entre humanos (também humanos assintomáticos) através de doação de sangue ou de órgãos (um número muito pequeno, mas já comprovado que possível) ou através de “rota normal”, através de flebotomíneos (que pode explicar a transmissão em centros urbanos onde as condições típicas observadas em zona rural e periferia não ocorrem). O mosquito flebotomíneo que transmite o parasita nas Américas (*Lutzomyia longipalpis* e, mais recentemente, também *Lutzomyia cruzi*) tem se mostrado altamente adaptável às áreas peri-urbanas e urbanas estabelecidas no Brasil há mais de trinta anos. Como resultado, o número de casos de LV no Brasil tem aumentado de forma constante (HARHAY et al., 2011).

A literatura emergente sugere que novas configurações da *Leishmania* em novos centros urbanos e peri-urbanos não são um fenômeno limitado ao Brasil (JERONIMO et al.,

2004; NASCIMENTO et al., 2008), mas também tem sido reportado, por exemplo, na Itália (TARALLO et al., 2010), Irã, México (SANCHEZ-GARCIA, 2010) e Marrocos (BOUSSAA et al., 2005). Esta mudança epidemiológica na ecologia das doenças, juntamente com migração das pessoas para as cidades, desperta uma preocupação adicional em áreas historicamente não endêmicas dentro da Europa (READY, 2010) e América do Norte (GONZALEZ et al., 2010), assim como se espalhou em países que já eram áreas endêmicas. Existem também potenciais mudanças favoráveis para o vetor tanto na Europa como na América do Norte, como as mudanças climáticas (READY, 2008). Nas Américas, o principal vetor, *Lutzomyia longipalpis*, é altamente adaptável à reprodução em novos ambientes habitados por humanos e densamente povoados (BAUZER et al., 2007; LAINSON; RANGEL, 2005), e pode viajar com os seres humanos e caninos em transportes coletivos como ônibus ou trens, utilizando, portanto, uma forma alternativa de infectar pessoas de maneira fácil e oculta. Novas rotas aéreas comerciais entre cidades endêmicas no Brasil (por exemplo, Belo Horizonte e Brasília) e cidades na Argentina para lugares na Europa (por exemplo, Lisboa, Portugal), onde a infecção canina tem sido relatada, pode representar outra via para o vetor infectar indivíduos assintomáticos, estabelecendo assim novas configurações de ecossistemas de saúde (COSTA; MIRANDA-SANTOS, 2011). Mesmo com números baixos, a LV pós-transplante tem sido relatada desde o início da década de 1990 (ANTINORI et al., 2008; BASSET et al., 2005; CLEMENTE et al., 2011; VEROUX et al., 2010).

Os estudos de Silva et al. (2001) mostraram que 6,7% dos seres humanos acometidos por esta doença no Brasil vão a óbito, podendo chegar a 17%. O aumento da incidência tem como causas principais: a devastação das florestas e aumento da população, falta de saneamento e higiene, bem como imunossupressão e desnutrição, que implicam na maior suscetibilidade do hospedeiro.

Dentre as ações recomendadas para controle da leishmaniose, encontram-se: diagnóstico oportuno e tratamento adequado dos casos humanos, vigilância e monitoramento canino com eutanásia de cães soro-reagentes. Para que se obtenha êxito nas ações citadas, faz-se necessário contar com diagnóstico laboratorial de alta especificidade, sensibilidade e maior agilidade de resposta.

Atualmente, a técnica de amplificação de ácidos nucléicos por reação em cadeia da polimerase (PCR) vem sendo utilizada na rotina laboratorial. Apesar de apresentar alta sensibilidade e especificidade, não é prática para aplicação em larga escala, pelo alto custo, por envolver pessoal qualificado e ser de difícil portabilidade (RAMOS-JESUS et al., 2011). Assim, o desenvolvimento de métodos para detectar quantitativamente a reação antígeno-

anticorpo de modo prático e seguro é desejável. Os biossensores surgem como alternativa promissora no desenvolvimento dessas técnicas, ao permitirem o diagnóstico de forma mais prática, econômica e rápida; a portabilidade permite sua operacionalização em áreas remotas, serviços de atendimento ambulatorial e programas de vigilância epidemiológica.

2.1 DIAGNÓSTICO DA LV

A confirmação do diagnóstico da leishmaniose canina visceral se dá através da detecção do parasito em amostras de baço em esfregaços corados, podendo-se também utilizar amostras de medula óssea, nódulos linfáticos ou fígado. No entanto, estes métodos são invasivos, pouco sensíveis e inadequados para inquéritos epidemiológicos (LEAL, 2009).

A reação de fixação de complemento (RFC) passou a ser utilizada em substituição aos métodos invasivos por pesquisadores brasileiros, trazendo a promessa de maior sensibilidade e especificidade, inclusive propondo a inexistência de reação cruzada com infecções por outras enfermidades, mesmo quanto utilizados antígenos heterólogos. No entanto, passou a apresentar reação cruzada com títulos de anticorpos baixos entre doença de chagas e leishmaniose. Portanto, para confirmação de diagnóstico de leishmaniose por RFC em soros com título abaixo de 1:80, faz-se necessário a confirmação por outros métodos (LEAL, 2009). A reação de imunofluorescência indireta (RIFI) foi implementada no diagnóstico da

LV a partir da década de 60, demonstrando uma sensibilidade que varia de 90 a 100% e especificidade que chega a 80%, apresentando reações cruzadas com outros tripanossomatídeos, como na Doença de Chagas e na Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) (LEAL, 2009).

Na década de 70, surgiu o aperfeiçoamento da técnica de ELISA para leishmaniose, através da utilização de antígenos recombinantes ou purificados e glicoproteínas de membrana, como gp63, gp72, gp70 e rK39, específicas do gênero *Leishmania*, ocorreu uma melhora da sensibilidade e especificidade deste método em relação aos anteriormente utilizados, no entanto ainda são evidenciadas reações cruzadas para enfermidades causadas por outros tripanossomatídeos (AMIN et al., 1986; BADARÓ et al., 1996; JAFFE; ZALIS, 1988; OZENSOY et al., 1998).

O Teste de aglutinação em gota (DAT) foi descrito pela primeira vez em 1975 e foi considerado como um método alternativo ao diagnóstico da LV, pois quando avaliado em trabalhos comparativos com RIFI e ELISA apresentou sensibilidade e especificidade semelhantes ao ELISA e oferecendo as vantagens da praticidade de sua utilização e o baixo

custo (EVANS et al., 1990; HARITH et al., 1987).

Atualmente, a técnica mais sensível e específica para o diagnóstico da LV consiste na PCR. Esta possibilita a identificação e amplificação seletiva do DNA do cinetoplasto do parasita, no entanto, apresenta impedimentos para realização de inquéritos epidemiológicos pelo seu alto custo e dificuldade de adaptação ao diagnóstico em campo. Portanto, os métodos preconizados pelo Ministério da Saúde para inquérito epidemiológico, devido à sua fácil execução, rapidez e economia, são: RIFI, aglutinação direta e imunoenensaio enzimático (ELISA) (ALVES; BEVILACQUA, 2004). A reação de imunofluorescência indireta apresenta sensibilidade satisfatória à sua utilização em inquéritos epidemiológicos para LVC, no entanto, em regiões onde há ocorrência concomitante de LVC e Doença de Chagas este teste deve ser utilizado combinado com outro método, pois apresenta reação cruzada com outras espécies da família Trypanosomatidae. O ELISA detém altas especificidade e sensibilidade na detecção da LVC, respectivamente, 90% e 100%, no entanto não atende à necessidade de diagnóstico em campo, que é uma condição primordial para a eficácia do controle da LVA.

Biossensores também têm apresentado importante aplicabilidade na detecção de *Leishmania chagasi*, com boa reprodutibilidade e especificidade. A este exemplo, podemos citar um imunossensor de microbalança de cristal de quartzo, desenvolvido com antígenos recombinantes em eletrodo de ouro e que apresenta sensibilidade superior ao método de ELISA (RAMOS-JESUS et al., 2011).

2.2 ANTÍGENOS RECOMBINANTES

Inicialmente, extratos brutos contendo antígenos de leishmaniose foram os primeiros alvos utilizados no desenvolvimento de testes diagnósticos, no entanto, por apresentarem alta reatividade cruzada e especificidade e seletividade diagnóstica limitadas, aos poucos foram substituídos pelos antígenos purificados. O processo de purificação de antígenos é baseado em técnicas de cromatografia de troca iônica, imunoafinidade, entre outras (PESSOA JUNIOR; KILIKIAN, 2005; SILVA JUNIOR., 2004).

A utilização de antígenos recombinantes de *Leishmania sp.* apresenta grande vantagem em relação a antígenos não recombinantes. Trata-se do fato de que por serem isoladas com significativo grau de homogeneidade propiciam para o teste de imunoenensaio uma grande sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade, além de minimizar reações cruzadas com certos antígenos presentes em parasitos responsáveis por outras doenças

infeciosas, fato este observado quando do emprego de antígenos tradicionais, ou seja, não recombinantes (PASSOS et al., 2005).

Na última década, a utilização de antígenos recombinantes em ensaios sorológicos tem permitido elevada especificidade devido à possibilidade de se construir epítomos de diferentes porções proteicas do agente etiológico e ainda de diferentes formas evolutivas como ocorre em alguns parasitas com ciclo heteroxeno, como a *Leishmania* (LEAL, 2009). Através de técnicas moleculares, como o rastreamento de bibliotecas de expressão de genes de *Leishmania* utilizando soros de animais e de humanos infectados, diferentes moléculas antigênicas foram identificadas com uso potencial no desenvolvimento de vacinas e diagnóstico das leishmanioses (ALBERTS et al., 2006).

Antígenos recombinantes de citoesqueleto da *Leishmania infantum*, localizado em seu cinetoplasto, foram produzidos e utilizados em imunossensor com sucesso pelo grupo de Dutra. Este antígeno é composto por uma proteína de 70 kDa (rLci2B-NH6), ligado a seis histidinas através de seus grupamentos aminas terminais (RAMOS-JESUS et al., 2011).

2.3 BIOSSENSORES

Os biossensores são pequenos dispositivos que utilizam reações biológicas para detecção de analitos-alvo (WANG, 2000). Tais dispositivos combinam um componente biológico, que interage com um substrato alvo, a um transdutor físico, que converte os processos de biorreconhecimento em sinais mensuráveis (PATHAK; KATIYAR; GIRI, 2007; WANG, 2000). Seu uso traz uma série de vantagens, pois são altamente sensíveis e seletivos, relativamente fáceis em termos de desenvolvimento, além de acessíveis e prontos para uso. Entretanto, há certas limitações, como interferências eletroquimicamente ativas na amostra, pouca estabilidade a longo prazo e problemas de transferência de elétrons (MEHRVAR; ABDI, 2004; SONG; XU; FAN, 2006).

Os biossensores podem ser de detecção direta (sensor de detecção direta ou sistema não reticulado), nos quais a interação biológica é medida diretamente, havendo uso de um ligante não-catalítico, como receptores celulares e anticorpos, ou de detecção indireta (sensor marcado ou sistema reticulado), em que há o uso de anticorpos fluorescentemente marcados ou elementos catalíticos, como enzimas. O sistema reticulado tem uma maior estabilidade e é mais simples para usar, mas o sistema não reticulado tem melhor sensibilidade, tempo de operação mais curto e custos mais baixos (LIU; CAO; LU, 2009; MEHRVAR; ABDI, 2004; PATHAK; KATIYAR; GIRI, 2007).

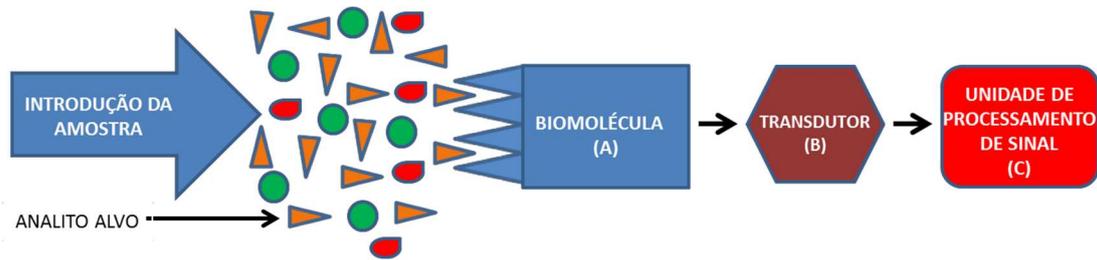
Há dois tipos de biossensores, dependendo da natureza do evento de reconhecimento: dispositivos de bioafinidade, que dependem da ligação seletiva do analito-alvo ao ligante preso à superfície (por exemplo, anticorpo ou sonda oligonucleotídica) e dispositivos bioanalíticos, nos quais uma enzima imobilizada é usada para o reconhecimento do substrato-alvo (WANG, 2000).

Na atualidade, têm-se usado métodos analíticos para identificação e determinação quantitativa e qualitativa de compostos bioquímicos e em variadas aplicações, como no diagnóstico de doenças provocadas por microrganismos, detecção de patógenos em bebidas lácteas e de substâncias químicas na defesa, segurança e monitoramento do meio ambiente. Os métodos analíticos convencionais (gravimetria, titulometria, espectroscopias de massa e Raman, interferometria, fotometria, refratometria) são bastante precisos e muito utilizados (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002). Todavia apresentam, normalmente, as seguintes desvantagens inerentes à análise bioquímica: a realização é feita em laboratório; o procedimento analítico é lento, além de oneroso, com necessidade de profissionais experientes e qualificados (MOREIRA et al., 2010). Na tentativa de minimizar essas desvantagens, novos métodos diagnósticos vêm sendo estudados e apresentando resultados promissores; dentre estes, os biossensores ganham destaque.

Os biossensores são dispositivos analíticos com capacidade de converter uma informação físico-química, como transformações químicas, liberação de calor, transferência de elétrons, interações biológicas (enzima-substrato/antígeno-anticorpo) em um sinal analítico, quantitativo ou semi-quantitativo. Basicamente, o biossensor é constituído por três partes integradas: o elemento biorreceptor, um transdutor e um sistema de processamento de sinal (PERUMAL; HASHIM, 2014), como pode ser visto na Figura 4.

Os biossensores são construídos a partir de um componente que introduz a amostra, um sistema de reconhecimento molecular, um transdutor e uma unidade processadora de sinal (LEE et al., 2008).

Figura 4 – Representação esquemática de um biossensor, mostrando a organização dos seus componentes funcionais. A detecção do analito-alvo é feita por um componente biológico que gera um sinal (A), o qual é convertido (B) e processado (C).



Fonte: O autor (2017).

Várias também são as opções de transdutores a serem acoplados aos componentes biológicos dos biossensores, entre eles: eletroquímicos, amperométricos, potenciométricos, condutimétricos, ópticos, piezoelétricos ou calorimétricos. Os eletroquímicos baseiam-se no movimento de íons e difusão de espécies eletroativas (FURTADO et al., 2008). São os biossensores mais comumente utilizados nos testes de monitoramento e diagnóstico em análises clínicas (GAUA et al., 2005; MEHRVAR; ABDI, 2004). Suas principais vantagens são baixo custo, alta sensibilidade, *screening* rápido e estabilidade (SONG; XU; FAN, 2006). Podem ser amperométricos, potenciométricos ou condutimétricos (MEHRVAR; ABDI, 2004). Os potenciométricos são baseados na determinação da diferença de potencial entre o eletrodo indicador e o de referência ou dois eletrodos de referência separados por uma membrana seletiva permeável, em que não há fluxo de corrente significativa entre eles (THÉVENOT et al., 2001). Os condutimétricos são baseados na medição de mudanças na condutância, devido ao uso de enzimas que, ao catalisar reações, produzem ou consomem espécies iônicas, alterando a quantidade de portadores de carga móvel no eletrólito. A condutividade é a função linear da concentração iônica, porém, não é específica para um dado tipo iônico (MELO, 2008; WANG et al., 2008). Os ópticos – fibra óptica, guia de onda planar, ressonância de superfície de plasma (SPR – *surface plasmon resonance*) (THÉVENOT et al., 2001) – são particularmente atraentes para aplicação em sistemas de detecção direta. São baseados na medição da luz observada ou emitida como um resultado de uma reação química ou biológica. Em tais biossensores, fibras ópticas são usadas para guiar as ondas de luz a detectores adequados, como um eletrodo ou semicondutor (MEHRVAR; ABDI, 2004). Os piezoelétricos – alteração de massa ou microviscosidade, onda de cisalhamento e superfície acústica (THÉVENOT et al., 2001; FURTADO et al., 2008) – são baseados no princípio de revestir a superfície do biossensor com uma substância biologicamente ativa que se liga seletivamente. A superfície revestida é colocada em uma

solução contendo analitos, os quais se ligam à substância ligante. Então, a massa do cristal aumenta enquanto a frequência de ressonância das oscilações diminui proporcionalmente (MEHRVAR; ABDI, 2004). Cristais de quartzo têm sido muito utilizados em sistemas piezoelétricos, pois sua frequência pode oscilar na faixa de megahertz (10⁶ ciclos/segundo) de maneira proporcional à massa do cristal, além de serem muito sensíveis às variações de massa. Essa alta sensibilidade levou à criação de um sensor denominado microbalança de cristal de quartzo (QCMB), que é capaz de detectar as variações de nanogramas que ocorrem em sua massa quando o alvo se liga ao sensor (WANG et al., 2011). Os calorimétricos, também chamados de termistor (THÉVENOT et al., 2001), detectam substratos baseados no calor envolvido nas reações bioquímicas do analito com uma substância biológica ativa adequada, como uma enzima. A forma mais utilizada acopla as substâncias diretamente ao termistor, que detecta o calor envolvido na reação bioquímica. A maior parte do calor em reações enzimáticas é perdida para o meio sem ser detectada. A perda do calor diminui a sensibilidade dos biossensores calorimétricos (MEHRVAR; ABDI, 2004).

Vários componentes biológicos apresentam-se como potenciais elementos a serem usados em sistemas de biossensores, entre eles: enzimas, anticorpos, ácidos nucleicos e aptâmeros. Os anticorpos podem ser produzidos pelas células B e são funcionalmente definidos pelo antígeno com o qual reagem. Assim, anticorpos gerais, com especificidade desconhecida (por exemplo, imunoglobulina sérica IgM), são chamados de imunoglobulina até serem definidos pelo antígeno específico (por exemplo, anti-sRBC IgM) (KLAASSEN, 2001). Todos os cinco tipos de imunoglobulina (IgA, IgD, IgE, IgG e IgM) são constituídas de cadeias pesadas (H) e leves (L) e regiões ou domínios constantes (C) e variáveis (V) (KLAASSEN, 2001). É a região V que determina a especificidade do anticorpo, pois a maioria das diferenças entre os anticorpos está em três pequenas extensões (com aproximadamente dez aminoácidos) de suas cadeias pesada (VH) e leve (VL). Essas pequenas extensões assumem estruturas em alça que, em conjunto, formam uma superfície complementar à estrutura tridimensional do antígeno ligado, sendo chamadas de segmentos hipervariáveis ou regiões determinantes de complementaridade (CDR). São ao todo seis alças na extremidade distal dos domínios V do receptor, sendo três de cada domínio (VH e VL). É possível ver, por análise cristalográfica dos complexos antígeno/anticorpo, que os aminoácidos da região CDR formam múltiplos contatos com o antígeno (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; JANEWAY JUNIOR et al., 2007). O uso de anticorpos como elemento de reconhecimento se baseia na alta sensibilidade e especificidade das interações antígeno/anticorpo. A maior vantagem dos chamados biossensores imunológicos é que não é

necessário purificar a amostra antes da detecção (CHAMBERS et al., 2008; SONG; XU; FAN, 2006).

Os biossensores de afinidade baseiam-se na formação de complexos entre o substrato e o receptor. Entre os sistemas de bioafinidade destacam-se as interações antígeno-anticorpo, lectina-carboidrato e a hibridização entre sequências de ácidos nucleicos de fita simples (BERTÓK et al., 2013; PERUMAL; HASHIM, 2014). Outra classe de biossensores utiliza biorreceptores sintéticos construídos na tentativa de mimetizar a seletividade das interações biológicas enzima-substrato, antígeno-anticorpo e fármaco-receptor (MUJAHIND; IQBAL; AFZAL, 2013).

2.3.1 Eletrodos impressos

Advinda uma adaptação da indústria de microeletrônica os eletrodos impressos, do inglês, *screen-printed electrodes* (SPE), têm se apresentado na confecção de componentes eletrônicos como capacitores, resistores e condutores em circuitos impressos, para produção em massa de eletrodos portáteis e descartáveis, aplicáveis em sistemas de sensoriamento. O potencial destes dispositivos para aplicação comercial pode ser demonstrado atualmente através dos *tips* sensores de mono uso utilizados para determinação da glicemia de indivíduos diabéticos, empregando glicosímetros (TALEAT; KHOSHROO; MAZLOUM-ARDAKANI, 2014).

As etapas básicas de confecção de um SPE consistem em preparação ou seleção da tinta, seleção da tela, impressão e secagem. O processo de confecção dos SPEs é baseado na deposição de finos filmes condutores sobre substratos inertes. A impressão do filme é feita através de uma tela molde em contato com o substrato, no qual o filme é depositado pela transferência do padrão do molde, podendo ser realizada manualmente ou automaticamente. A etapa final de impressão consiste na aplicação de uma camada parcial de um isolante para definir uma área a ser usada como contato elétrico. Os substratos mais utilizados para confecção dos SPEs são materiais com elevada inércia química e eletroquímica, tais como cerâmicas e materiais à base de plástico (FANJUL-BOLADO et al., 2008; NASCIMENTO; ANGNES, 1998; TALEAT; KHOSHROO; MAZLOUM-ARDAKANI, 2014).

2.3.2 Imunossensores

A especificidade do reconhecimento molecular entre antígenos e anticorpos na

formação de um complexo estável é o principal fundamento para o desenvolvimento de dispositivos analíticos baseados em imunoenaios (FERREIRA; YAMANAKA, 2006). Os biossensores que exploram esta interação designam-se imunossensores. A alta afinidade da interação do anticorpo ao seu alvo antigênico, principalmente quando monoespecífico, associada aos sistemas transdutores, possibilita a aplicação dos imunossensores para detecção de diferentes analitos com alta seletividade e sensibilidade (GOPINATH et al., 2014; LI et al., 2013).

2.3.3 Imobilização de anticorpos

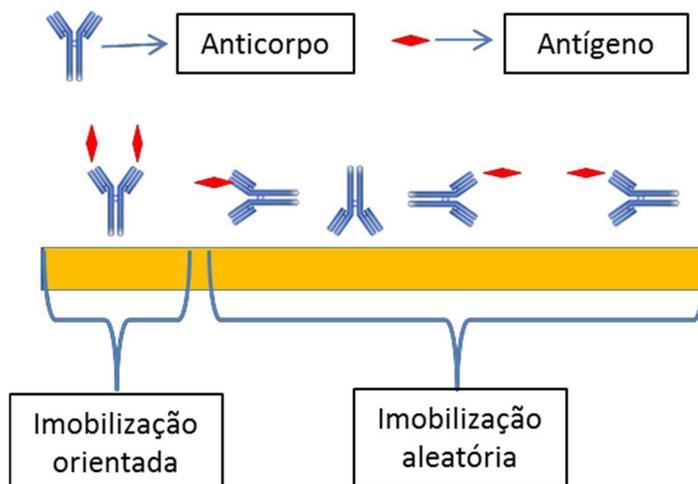
Há vários métodos possíveis de uso para manter a biomolécula presente na área sensora, dentre eles podemos destacar:

- a) adsorção - pode ser usada como método simples e rápido para imobilização através de ligações de van der Waals entre a biomolécula e a superfície do eletrodo. No entanto este processo não permite uma imobilização controlada, além de promover ligação fraca, possibilitando à biomolécula sofrer ação de pH e temperatura e lixiviar;
- b) ligações cruzadas por meio do glutaraldeído - A imobilização utilizando ligações cruzadas sobre uma camada de glutaraldeído resulta em material totalmente insolúvel em água e promovendo ligações fortes;
- c) aprisionamento - outra forma de promover a imobilização, por aprisionamento de material biológico, através de ligações bi-dimensionais, tri- dimensionais ou multi dimensionais;
- d) eletropolimerização - também pode ser usada para promover a manutenção da biomolécula desejada na superfície sensora de forma atraente e fácil, este processo pode ser auxiliado por meio de polímeros: politiofeno, polianilina, polipirrol, ortofenilenodiamina e outros (ALBAREDA-SIRVENT; MERKOÇI; ALEGRET, 2000).

Para o desenvolvimento de um biossensor eficaz e estável, se faz necessário que se escolha um método de imobilização capaz de promover uma ancoragem estável e que permita controle da orientação dos anticorpos sobre a superfície sensora, visto que a manutenção da capacidade de reconhecimento antigênico e especificidade dos anticorpos podem influenciar diretamente a sensibilidade analítica do dispositivo. A disposição dos sítios antigênicos sobre a superfície sensora mostra claramente como a orientação afeta a densidade superficial de

anticorpos imobilizados e a interação de biorreconhecimento (Figura 5). A imobilização aleatória dos anticorpos dificulta a exposição adequada dos sítios antigênicos, afetando a interação antígeno-anticorpo sobre a superfície sensora. Em geral, os métodos de imobilização para imunossensores empregam ligações covalentes ou não covalentes. Embora bastante tradicional devido à simplicidade, o método de ligação não covalente possibilita baixa alteração na conformação da molécula na superfície sensora, preservando mais o microambiente da biomolécula, visto que elas são suscetíveis às mudanças de pH, temperatura e força iônica do meio. Deste método resultam principalmente ligações fracas, tais como ligações iônicas, interações eletrostáticas e hidrofóbicas e forças de van der Waals (RAMÍREZ; SALGADO; VALDMAN, 2009).

Figura 5 – Representação esquemática da imobilização de anticorpos de forma aleatória e orientada.



Fonte: O autor (2017).

Para realização de ligações covalentes, a reatividade de grupos funcionais presentes nas cadeias de aminoácidos do anticorpo, tais como grupos amina ($-NH_2$), tiol ($-SH$), hidroxílicos ($-OH$), carboxílicos ($-COOH$), entre outros devem ser usados para promover uma ligação estável e irreversível com a superfície a ser imobilizada. De modo geral, as superfícies inorgânicas como os eletrodos de tinta de carbono, carbono vítreo, ouro, platina, etc. bastante utilizados nos biossensores, não disponibilizam grupos químicos reativos a estes grupos funcionais. Deste modo, a funcionalização do suporte eletródico deve ser realizada química ou fisicamente para ancoramento da biomolécula. Um dos métodos de funcionalização mais utilizados na última década, são promovidos através de monocamadas auto-organizadas. Estas apresentam como vantagens sua facilidade de preparação e a possibilidade de introduzir diferentes funcionalidades químicas; quando utilizadas para

processos de imobilização, promovem uma imobilização orientada (DUTRA et al., 2007), entretanto o primeiro é preferível devido às lavagens requeridas para remoção das ligações não específicas, típicas dos imunoenaios.

Comumente, em sensores eletroquímicos, as SAMs são realizadas através da química tiol-ouro de forma muito reprodutível e ordenada, sobre eletrodos de ouro. Nesta perspectiva, o procedimento de imobilização geralmente envolve duas etapas separadas. O primeiro é a criação de SAM com um agente de ligação contendo um tiol como por exemplo a cisteamina, em uma das extremidades e um grupo funcional (de ácido carboxílico, amina, etc.) (RICCI; ADORNETTO; PALLESCHI, 2012).

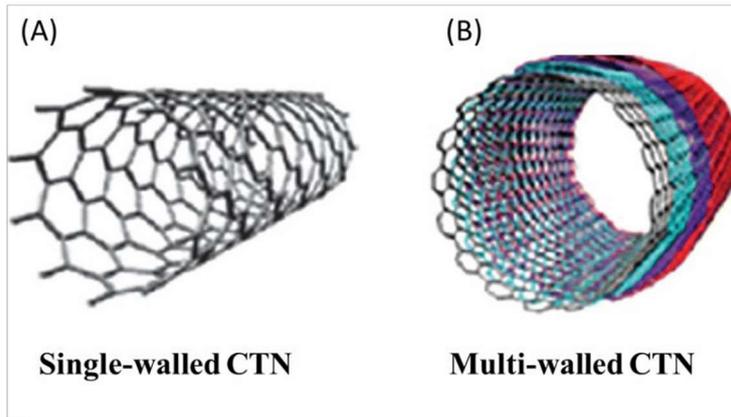
A cistamina (2,2-diaminoetildissulfeto) é um amino-sulfeto orgânico de cadeia curta muito utilizada para a preparação de camadas auto-organizadas. Os átomos de enxofre dessa molécula se ligam fortemente a superfícies de ouro, introduzindo a este, grupamentos amino que estão do lado oposto aos sulfetos 22. Os eletrodos modificados com amino-grupos por sua vez podem fornecer sítios para ligação covalente com várias moléculas (FREIRE; PESSOA; KUBOTA, 2003).

2.3.4 Nanotubos de carbono

Nanotubos de carbono (do inglês *Carbon Nanotubes*, CNTs) têm ampla aplicação no desenvolvimento de sensores e biossensores modificados promovendo considerável aumento da área eletroativa, e diminuição do sobrepotencial de trabalho (KAVAN; DUNSCH; KATAURA, 2014). Têm sido utilizados na fabricação de biossensores eletroquímicos enzimático (KAVAN; DUNSCH; KATAURA, 2014; WANG; LIN, 2008) e desde sua descrição por Iijima (1991), houve um aumento acentuado de estudos sobre as propriedades físicas e químicas destes materiais (KATZ; WILLNER, 2004; RIVAS et al., 2007; WANG; LIN, 2008). Os nanotubos de carbono apresentam estruturas tubulares na ordem de nanômetros e comprimentos de micrometros, tendo uma área superficial muito maior quando comparada com o seu volume. Eles podem ser de parede simples (do inglês - *Single-walled Carbon Nanotubes* (SWCNTs) ou de parede múltipla (do inglês *Multi-walled Carbon Nanotubes* (MWCNTs) com até dezenas de cilindros concêntricos com um espaçamento entre eles de 0,3-0,4 nm (Figura 6). A dopagem dos CNTs ou a sua funcionalização, por exemplo, com enzimas, proteínas redox, pode mudar as suas propriedades químicas e/ou mecânicas e apresentam aplicações diversas em várias áreas de interesse (KATZ; WILLNER, 2004). Os CNTs podem ser utilizados para modificar a superfície de eletrodos, melhorando as

propriedades de detecção destes dispositivos eletroquímicos (BASIUK; BASIUK, 2004; GOODING, 2005; LI, 2005; LIN et al., 2004; MERKOCI, 2006).

Figura 6 – Desenho esquemático dos diferentes tipos de nanotubos de carbono multi-walled (A) e single-walled (B). Os diâmetros médios para os nanotubos do tipo multi-walled variam de 10 a 100 nm e do tipo single-walled variam de 2 a 50 nm.



Fonte: The World of Nanoscience ([201?]).

A condução dos CNTs depende de vários fatores, o que lhes proporciona características de um metal ou mesmo de um semiconductor. A forma como ele foi obtido, tratado ou mesmo como e sua conformação para a formação do tubo pode influenciar. Por exemplo, a direção do plano da folha de grafeno e seu diâmetro pode dar diferentes estruturas morfológicas aos CNTs. No caso dos MWCNTs, pode se observar as estruturas nos formatos do tipo “tubo oco”, “espinha de peixe” e “bambu”. Além disso, as extremidades dos tubos podem apresentar duas formas, o plano basal e o plano de borda. Acredita-se que o plano de borda é o maior responsável pela condução eletrônica dos CNTs (JI et al., 2010; WILDGOOSE et al., 2006).

O tratamento ácido dos CNTs é assunto de várias revisões. Como as paredes dos CNTs possuem baixa reatividade, a funcionalização é utilizada para a geração de grupos funcionais (por exemplo, - COOH, - OH, - C=O ou C-NH₂) na superfície e/ou extremidades do material. Com isto, os CNTs podem ser utilizados para a imobilização de moléculas pequenas ou moléculas biologicamente ativas, como enzimas, além de poderem ser modificados com polímeros sobre suas paredes (ZHAO; GAN; ZHUANG, 2002; ZHOU et al., 2009).

2.3.5 Medidas eletroquímicas

Através da eletroquímica é possível avaliar a relação existente entre fenômenos físicos e químicos, associados à transferência de elétrons que pode acontecer homogeneamente em solução ou heterogeneamente na superfície do eletrodo.

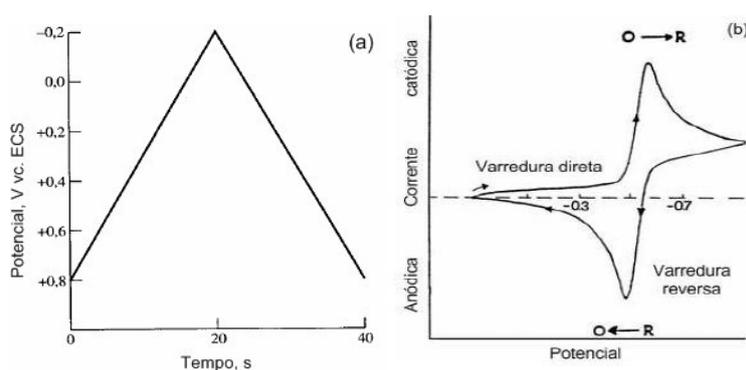
O fenômeno elétrico que ocorre em uma reação química, como por exemplo, em uma pilha ou em uma eletrodeposição, caracterizam-se como processos eletroquímicos. Durante esses processos podemos aferir medidas de alterações de corrente, potencial, condutância, impedância, capacitância, entre outras. Dentro de uma célula eletroquímica, composta por três eletrodos: Eletrodo de referência (ER), que mantém a diferença de potencial em relação ao eletrodo de trabalho, o Contra Eletrodo (CE), utilizado para descarga de sobrepotência no eletrodo de trabalho e o Eletrodo de Trabalho (ET), onde ocorrem os processos eletroquímicos de interesse; a técnica eletroquímica é importante ferramenta que oferece opções viáveis para mediar problemas na elaboração de novos métodos diagnósticos, modificações de superfície, apresentando dentre suas vantagens, a possibilidade de trabalhar com quantidades infimamente reduzidas reagentes nas análises, fácil controle das variáveis que combinadas de maneira variada, conduzem a técnicas eletroquímicas particulares como voltametria cíclica (VC), voltametria de onda quadrada (SWV) e voltametria de pulso diferencial (VPD), dentre outras (BARD; FAULKNER, 2010; CABRAL, 2014; MENEZES, 2014; SANTOS, 2012).

2.3.5.1 Voltametria cíclica

A voltametria cíclica é uma das técnicas eletroquímicas mais empregadas na caracterização de um processo eletródico, nela registra-se a resposta da corrente de um eletrodo estacionário e pequeno em uma solução sem agitação quando este é excitado por uma onda triangular de potencial. O potencial varia linearmente em uma direção até um dado valor, então, a direção da varredura é invertida e o potencial volta ao valor inicial aplicado, como mostra a figura 7. Os potenciais nos quais ocorre a reversão são chamados potenciais de inversão. O intervalo de potenciais de inversão escolhido para um dado experimento é aquele no qual ocorre a oxidação ou a redução controlada por difusão de um ou mais analitos. A direção da varredura inicial pode ser tanto negativa como positiva, dependendo da composição da amostra (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002). Neste processo, uma corrente capacitiva é gerada, correspondendo às alterações na dupla camada do eletrodo após aplicação

do potencial, decaindo rapidamente. Adicionalmente, correntes farádicas podem ser mensuradas através da transferência de carga de reações redox de espécies eletroativas. Este processo obedece à lei de Faraday, a qual determina que a quantidade de reagentes formados ou consumidos na interface do eletrodo é proporcional à corrente (BARD; FAULKNER, 2001; BRETT; BRETT, 1993; LOWINSOHN; BERTOTTI, 2006).

Figura 7 – Voltametria cíclica: (a) Sinal de excitação para a voltametria cíclica e, (b) Voltamograma cíclico para um processo redox reversível.



Fonte: Skoog, Holler e Nieman (2002) e Wang (2001).

Embora seja pouco utilizada em análises quantitativas, a técnica de CV é muito empregada para obtenção de informações sobre os processos eletroquímicos, como reações redox, detecção de intermediários de reações, observação e acompanhamento de reações envolvendo produtos formados nos eletrodos, etc. Geralmente, é a primeira técnica selecionada na investigação de um sistema que contém espécies eletroativas, uma vez que indica o potencial redox destas espécies (HARRIS, 2005; SKOOG et al., 2008).

A resposta em corrente neste método é obtida quando se submete o eletrodo de trabalho a uma onda triangular de potencial controlado, no qual o mesmo é linearmente variado com o tempo, partindo de um valor inicial até um final. Durante a varredura do potencial, o potenciostato registra a corrente que é gerada em função do potencial aplicado. Obtém-se como resposta a essa perturbação, por exemplo, um par de picos catódico e anódico registrados em uma curva voltamétrica na qual se relaciona a variação da corrente (eixo y) vs. a variação de potencial (eixo x), representando o voltamograma cíclico (Figura 7). Os principais parâmetros analisados em um voltamograma cíclico são: os potenciais de pico catódico (E_{pc}) e anódico (E_{pa}), e as correntes de pico catódico (I_{pc}) e anódico (I_{pa}). Esses dados oferecem informações importantes quanto à reversibilidade da transferência de elétrons (BARD; FAULKNER, 2001; HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009; PACHECO et al., 2013).

Para uma reação reversível, ou seja, uma reação que ocorre com velocidade suficientemente alta para estabelecer um equilíbrio dinâmico na interface sensora, as correntes de I_{pa} e I_{pc} variam linear e proporcionalmente com a raiz quadrada da velocidade de varredura de potencial. Neste sistema, os produtos gerados podem ser novamente oxidados ou reduzidos na superfície do eletrodo, resultando picos catódicos e anódicos em potenciais simétricos. Outros critérios adotados para determinação de um sistema reversível são: a razão entre as correntes de I_{pa} e I_{pc} aproximadamente iguais e a não variação dos potenciais de pico (E_{pa} ou E_{pc}) em relação à velocidade de varredura (YUAN et al., 2010). A primeira análise teórica de um sistema reversível foi descrita por Randles (1948), na qual é possível obter a corrente de pico (I_p) como indicado na seguinte equação:

$$I_p = (2,69 \cdot 10^5) n^{2/3} A D_0^{1/2} v^{1/2} C_0 \quad (1)$$

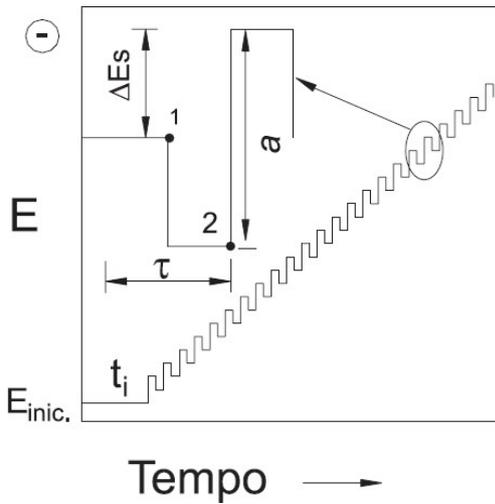
Onde, n é o número de elétrons envolvidos no processo, A é a área do eletrodo (cm^2), D_0 é o coeficiente de difusão ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$), C_0 é a concentração da espécie em solução (mol cm^{-3}) e v é a velocidade de varredura (V s^{-1}).

2.3.5.2 Voltametria de onda quadrada

Técnica voltamétrica de pulso das mais rápidas e sensíveis, a voltametria de onda quadrada, do inglês *Square Wave Voltammetry* (SWV), apresenta limites de detecção passíveis de comparação com das técnicas cromatográficas e espectroscópicas. Além disso, a análise dos parâmetros característicos desta técnica também possibilita a avaliação cinética e mecanística do processo eletródico em estudo.

A voltametria de onda quadrada é uma técnica voltamétrica de pulso onde a forma do pico de corrente resultante é proveniente da sobreposição de pulsos de potencial de altura a (amplitude de pulsos), a uma escada de potenciais de largura ΔE_s (incremento de varredura de potenciais) e duração $2t$ (período). As medidas de corrente são feitas no final dos pulsos diretos e reversos e o sinal obtido, após derivação, é dado como uma intensidade da corrente resultante, apresentando excelente sensibilidade e alta rejeição a correntes capacitivas (OSTERYOUNG; OSTERYOUNG, 1985). O pico voltamétrico resultante apresenta posição, largura e altura características do tipo de sistema redox avaliado (O'DEA; WOJCIECHOWSKI; OSTERYOUNG, 1985). A figura 8 apresenta a forma de aplicação do potencial da SWV.

Figura 8 – Forma de aplicação do potencial na voltametria de onda quadrada.



Fonte: Souza et al. (2004).

Uma das grandes vantagens da SWV em relação às outras técnicas voltamétricas é que sua teoria e os modelos matemáticos utilizados nos critérios de diagnóstico de tipos de processos redox foram desenvolvidos considerando-se, também, as espécies eletroativas adsorvidas na superfície eletródica e reações redox totalmente irreversíveis. Tais critérios de diagnóstico são muito importantes em eletroquímica, especialmente na análise de compostos orgânicos, onde os processos de adsorção provocam um efeito complexo nas respostas voltamétricas, efeito este dependente da quantidade em que reagente, produto, ou ambas as espécies adsorvem, da força e da dependência do potencial de adsorção, do eletrólito suporte utilizado e, também, da forma de aplicação do potencial. Além disto, processos redox totalmente irreversíveis são muito comuns em diversos tipos de compostos orgânicos contendo anéis aromáticos homocíclicos ou heterocíclicos com grupos ligantes eletroativos. Tais grupos são superfícies ativas e sofrem reduções e/ou oxidações totalmente irreversíveis, devido à baixa velocidade de transferência de carga, ou, muitas vezes, por uma rápida desativação do produto de reação redox, devido a um processo de protonação irreversível seguido por uma transferência de carga (SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003).

A SWV apresenta diversas vantagens em relação a outras técnicas eletroquímicas de aferição, destacamos entre elas:

- a) ausência da interferência proveniente da corrente capacitiva, já que as medidas de corrente são realizadas ao final do degrau de potencial onde a corrente capacitiva já se tornou negligenciável, melhorando a resolução dos dados experimentais, a sensibilidade analítica e, ainda, possibilitando a realização das

análises em altas velocidades de varredura;

- b) análise de componentes de corrente direta e reversa possibilita a obtenção de dados mecanísticos semelhantes àqueles obtidos por voltametria cíclica, porém com maior sensibilidade, devido à minimização das correntes capacitivas. Como limitação apresentada pela SWV é importante salientar que, apesar dos modelos teóricos desenvolvidos por Lóvric e Osteryoung abrangerem processos redox reversíveis, irreversíveis e quase-reversíveis, com adsorção de produtos e/ou reagentes e também na ausência de processos de adsorção, a aplicação em processos redox envolvendo reações químicas acopladas, ou seja, reações químicas ocorrendo antes ou após a transferência eletrônica ainda se necessitam estudos mais detalhados, a fim de melhor aplicar-se os modelos para estudos mecanísticos e cinéticos. Porém, para aplicações analíticas esta ainda é a técnica voltamétrica que fornece os melhores resultados em termos de intensidade de corrente e perfil voltamétrico, independentemente do tipo de processo redox envolvido.

2.4 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER

Atualmente, a espectroscopia infravermelha corresponde a uma das técnicas analíticas disponíveis de maior importância. Uma das maiores vantagens apresentadas por esta técnica é sua possibilidade de analisar qualquer tipo de amostra e em qualquer estado: líquidos, soluções, pastas, pós, filmes, fibras, superfícies de gases. Todos estes podem ser examinados com uma escolha criteriosa da técnica de amostragem.

A espectroscopia de Fourier Transformada (FTIR) representa um instrumento que através de um bem definido processo matemático pôde melhorar dramaticamente a qualidade do infravermelho, melhorando os espectros e reduzindo o tempo necessário para se obter dados. Além disso, com constante melhorias para computadores, espectroscopia no infravermelho ainda obteve muito mais avanços.

Esta técnica é baseada na vibração dos átomos de uma molécula. Incidindo-se uma radiação infravermelha em uma amostra, torna-se possível determinar qual a fração da radiação incidente foi absorvida. A energia de cada pico, em um espectro de absorbância mostra-se correspondendo à frequência de uma vibração de uma parte da molécula da amostra (STUART, 2004).

Diante dessas características, esta técnica representa uma importante alternativa para confirmação da presença e caracterização topográfica de matrizes depositadas sobre áreas sensoras.

3 OBJETIVOS

Os objetivos que nortearam o desenvolvimento desta tese estão apresentados abaixo, divididos entre objetivo geral e objetivos específicos.

3.1 OBJETIVO GERAL

Esta tese teve por objetivo maior desenvolver um imunossensor eletroquímico baseado em antígenos recombinantes específicos para o diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Imobilizar antígeno recombinante de *L. chagasi* sobre a superfície de eletrodo de ouro;
- b) Promover a ligação estável de NTC às superfícies modificadas por SAMs;
- c) Caracterizar a matriz de imobilização da biomolécula por técnicas eletroquímicas, microscópicas e estruturais;
- d) Otimizar condições experimentais: concentração de cisteamina, carga de antígenos recombinantes rLci2B-NH6;
- e) Propor estratégias de minimização de ligações não específicas; e
- f) Testar o imunossensor na detecção de anticorpos anti-*Leishmania chagasi* em soro canino.

4 PATENTE

Neste capítulo, será apresentada a patente de desenvolvimento de um imunossensor eletroquímico baseado em antígenos recombinantes específicos, para o diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina.

4.1 PROTOCOLO DE DEPÓSITO DE PEDIDO DE PATENTE

 INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL PROTOCOLO SEMA		019160000112 10:47 REPE	
18/07/2016		019160000112 10:47 REPE	
		BR 10 2016 016550 4	
Espaço reservado para o protocolo		Espaço reservado para a etiqueta	
Espaço reservado para o protocolo		Espaço reservado para o código QR	
 INPI INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL Sistema de Gestão da Qualidade Diretoria de Patentes			
		Tipo de Documento: Formulário	
Título do Documento: Depósito de Pedido de Patente		DIRPA Código: FQ001 Versão: 2 Procedimento: DIRPA-PQ006	
Página: 1/3			
Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial: O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas:			
1. Depositante (71):			
1.1 Nome: ROSA AMALIA FIREMAN DUTRA			
1.2 Qualificação: ENGENHEIRA ELETRONICA			
1.3 CNPJ/CPF: 42818079420			
1.4 Endereço Completo: RUA GENERAL ABREU E LIMA 113 APTO 701 TAMARINEIRA			
1.5 CEP: 52041-040			
1.6 Telefone: 81 997936788			
1.7 Fax:			
1.8 E-mail: rfiremandutra@yahoo.com.br			
<input type="checkbox"/> continua em folha anexa			
2. Natureza:			
<input checked="" type="checkbox"/> Invenção <input type="checkbox"/> Modelo de Utilidade <input type="checkbox"/> Certificado de Adição			
3. Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):			
"NANOSSENSOR COMPOSTO DE ELETRODO IMPRESSO A BASE DE NANOESTRUTURAS DE CARBONO PARA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA"			
<input type="checkbox"/> continua em folha anexa			
4. Pedido de Divisão: do pedido N°		Data de Depósito:	
5. Prioridade:		<input type="checkbox"/> Interna (66) <input type="checkbox"/> Unionista (30)	
O depositante reivindica a(s) seguinte(s):			
País ou Organização do depósito		Número do depósito (se disponível)	
Data de depósito			

4.2 DESCRIÇÃO DA PATENTE

Patente depositada junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI), no dia 18 de julho de 2016, sob protocolo BR 10 2016 01650 4, intitulada:

“NANOSSENSOR COMPOSTO DE ELETRODO IMPRESSO A BASE DE NANOESTRUTURAS DE CARBONO PARA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA”

[1] A presente intervenção trata de nanossensor com aplicação na área de diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina (LVC) visando tornar possível o diagnóstico desta doença em campo com níveis de sensibilidade e especificidade superiores ou equiparados aos testes diagnósticos adotados pelos órgãos oficiais do governo para realização de inquérito epidemiológico como: imunofluorescência indireta (RIFI) e Imunoensaio enzimático (ELISA).

[2] Atualmente, a técnica de amplificação de ácidos nucleicos por reação em cadeia da polimerase (PCR) vem sendo utilizada na rotina laboratorial. Apesar de apresentar alta sensibilidade e especificidade, não são práticas para aplicação em larga escala, pelo alto custo, por envolverem pessoal qualificado e serem de difícil portabilidade (RAMOS-JESUS et al., 2011)

[3] A reação de imunofluorescência indireta foi implementada no diagnóstico da LV, a partir da década de 60, demonstrando uma sensibilidade que varia de 90 a 100% e especificidade que chega a 80%, apresentando reações cruzadas com outros tripanossomatídeos como na doença de chagas e na Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA).

[4] A intradermoreação de Montenegro que também tem aplicação neste diagnóstico, não apresenta boa sensibilidade durante a fase de desenvolvimento da LVC.

[5] A reação de Imunofluorescência indireta apresenta sensibilidade satisfatória a sua utilização em inquéritos epidemiológicos para LVC, no entanto, em regiões onde há ocorrência concomitante de LVC e doença de Chagas este teste deve ser utilizado combinado com outro método, pois pode apresentar reação cruzada com outras espécies da família Tripanossomatidae.

[6] O ELISA detém altas especificidade e sensibilidade, no entanto não atende à necessidade de diagnóstico em campo, que é uma condição primordial para a eficácia do

controle da LVA.

[7] Com o intuito de solucionar tais problemas, desenvolveu-se a presente invenção, um nanossensor para detecção de leishmaniose visceral canina caracterizado por um eletrodo impresso descartável modificado com nanoestruturas de carbono ancoradas sobre filme polimérico com antígenos recombinantes ancorados nesta matriz. Este dispositivo permite a realização de inquéritos epidemiológico em nível de sensibilidade superior aos testes de ELISA e RIFI, além de especificidade equiparada ao imunoensaio enzimático (ELISA). Destacando-se destes testes diagnósticos por apresentar a característica de portabilidade, que permite sua operacionalização em áreas remotas, serviços de atendimento ambulatorial e programas de vigilância epidemiológica e ainda sem a necessidade de operador com altos níveis técnicos.

[8] A Figura 1 representa um voltamograma cíclico que mostra a mudança de potencial após a deposição da camada do filme de cisteamina (2,2-diaminoetildissulfeto) em solução alcoólica, que tem caráter discretamente isolante, o qual foi depositado sobre superfície de ouro do eletrodo ligando-se a esta por meio de ligações fortes entre Au-S e formando monocamadas auto-organizadas de filmes de alcanotióis.

[9] A Figura 2 representa a ampliação do sinal após a ligação dos nanotubos de carbono (curva B) ao eletrodo contendo o filme de cisteamina (2,2-diaminoetildissulfeto), através de deposição de Nanotubos carboxilados disperso em dimetilformamida e pré-ativado em solução contendo tampão fosfato de sódio salino (10mM) contendo 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) cloridrato de carbodiimida (EDC), N-hidroxisuccinimida (NHS).

[10] A Figura 3 refere-se às modificações, mensuradas através de voltametria cíclica sobre um eletrodo não modificado (curva A). Na curva “B” é possível verificar comportamento elétrico da área sensora após a deposição do antígeno recombinante da LVC sobre a matriz nanoestruturada, seguida da deposição do soro positivo para LVC possibilitando a ligação dos anticorpos (curva C).

[11] Na Figura 4 observa-se o estudo realizado com o nanossensor frente a soros de cães infectados com LVC e soros controle negativos (soros de animais previamente testados pelo método de ELISA, com resultados positivos e negativos para leishmaniose), através da técnica de voltametria de onda quadrada. Neste observam-se as variações de resposta através do delta de corrente que nos eletrodos testados com soros positivos verificou-se um aumento de corrente de 590% maior do que quando utilizados soros de animais não infectados, mostrando a capacidade de diferenciar amostras de soros negativas de positivas.

[12] Na Figura 5 observa-se resultados de corrente, por técnica de voltametria de onda quadrada, para representação da reprodutibilidade deste imunossensor quando estudado sob condições estabelecidas no Anti-c-rLci2B-NH6/Glycine/rLci2B-NH6/COOH-CTN-EDC-NHS/SAM/eletrodo de ouro, em 8 repetições. As leituras foram obtidas utilizando solução de 10 ml de 4 mmol L⁻¹ K₃Fe (CN)₆, a uma velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹. Após as medições dos picos de corrente catódica obtidas, verificou-se que o imunossensor apresentou boa reprodutibilidade, com um coeficiente de variação de 3,02%.

[13] A Figura 6 refere-se ao estudo da estabilidade deste nanossensor frente a repetidos cíclicos sob diferentes velocidades de varredura (30 a 180 mV s⁻¹) em 10 mL 4 mmol L⁻¹ K₃Fe(CN)₆ solução Glicina/rLci2B-NH6/COOH-CTN-EDC-NHS/SAM/eletrodo de ouro (Figura 6(A)). Observa-se que os picos das correntes catódicas e anódicas foram modificados com a velocidade de varredura. As correntes de picos anódicos e catódicos aumentaram linearmente com o aumento da raiz quadrada da velocidade de varredura, o que indica uma difusão controlada de transferência de elétrons (Figura 6(B)).

[14] Na figura 7 verifica-se a resposta da curva de calibração do imunossensor com soro de cães positivos e negativos de para Leishmaniose, no qual se observa o comportamento da reta que representa o soro positivo com inclinação 3,5 vezes superior ao soro negativo quando as amostras foram diluídas em tampão fosfato de sódio salino (10mM).

[15] A Figura 8 é referente às análises de FT-IR (espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier) para avaliação das vibrações específicas para grupamentos químicos que compuseram o nanocompósito, confirmando a presença do alcanotiól e do nanotubos de carbono carboxilado. A cisteamina foi utilizada por apresentar grupos tiol (-SH) que interagem com o eletrodo impresso de ouro (IEAu). O estiramento correspondente ao grupo tiol ocorre, em geral, entre 2550-2600 cm⁻¹. Pela análise dos espectros obtidos, observa-se que este estiramento ocorre em 2358 cm⁻¹ indicando que houve uma interação (por este grupo), ou seja entre a cisteamina e a superfície de ouro do eletrodo impresso. A presença dos nanotubos carboxilados é confirmada pelo grupamento OH, correspondendo ao espectro da banda 3320. Desta forma os grupos amina podem posteriormente interagir com o antígeno (ou anticorpo) desejado.

[16] Figura 9 refere-se a representação esquemática da montagem da superfície eletródica do nanossensor.

REIVINDICAÇÕES

1. Nanossensor composto de eletrodo impresso a base de nanoestruturas de carbono para leishmaniose visceral canina, caracterizado por um sistema tri-eletródico tendo como eletrodo de trabalho um eletrodo de ouro contendo filme nanoestruturado para detecção de LVC
2. Nanossensor composto de eletrodo impresso a base de nanoestruturas de carbono para leishmaniose visceral canina, caracterizado por uso de monocamadas auto-organizadas de filmes de alcanotióis revestidos com nanoestruturas de alótropos de carbono contendo grupos carboxílicos para ligações amida com proteínas.
3. Nanossensor composto de eletrodo impresso a base de nanoestruturas de carbono para leishmaniose visceral canina de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por compreender as seguintes etapas:
 - a) Funcionalização (quando necessária) dos alótropos de carbono, seguida de dispersão em solventes orgânicos, por exemplo, dimetilformamida, etanol, tetrahidrofurano, acetato de etila;
 - b) Deposição de filme de alcanotióis (2-aminoetanotiol), seguido por deposição de nanotubos de carbono carboxilados;
 - c) Imobilização orientada de antígenos recombinantes contendo cauda de histidina, podendo-se imobilizar diferentes moléculas para reconhecimento do analito alvo, variando de acordo com o sensor ou biossensor desejado;
 - d) Bloqueio de ligações não específicas com uma solução de (10 a 50 mM) de glicina em meio levemente ácido, podendo ser substituída por solução de albumina sérica bovina ou caseína.
4. Nanossensor descrito na reivindicação 2, caracterizado por filme de alcanotióis podendo ser substituídos por filmes de alcóxissilanos (2-aminopropiltriétoxissilano, alquiltriclorossilano e octadecil triclorossilano) quando substituídos os eletrodos de ouro por silício, vidro ou carbono.
5. Nanossensor descrito na reivindicação 2, caracterizado por eletrodo de ouro podendo este ser substituído por eletrodos de prata, platina e outros metais.
6. Nanossensor composto de eletrodo impresso a base de nanoestruturas de carbono para leishmaniose visceral canina caracterizado por antígeno recombinante desenvolvido conforme descrito na patente depósito PI 0900961-2 A2 INPI Brasil.
7. Nanossensor composto de eletrodo impresso a base de nanoestruturas de carbono,

caracterizado por possibilidade de aplicação em detecção de LVC e outras doenças caracterizadas por ligação antígeno-anticorpo, DNA-RNA, lectina-carboidratos e outras espécies biológicas.

8. Nanossensor descrito na reivindicação 2, caracterizado por uso de nanomateriais carbonáceos que podem ser funcionalizados por métodos covalentes ou não covalentes, de forma a possibilitar a ligação de grupos ou moléculas específicas que irão interagir com o analito alvo de modo covalente. O tipo de funcionalização utilizado é dependente da molécula a ser imobilizada no sensor, por exemplo, um anticorpo, antígeno, DNA, metal, variando em função da estrutura química da molécula sensora;
9. Nanossensor composto de eletrodo impresso a base de nanoestruturas de carbono para leishmaniose visceral canina caracterizado por ser capaz detectar anticorpos em amostras de cães infectados em título de detecção de 1/512, quando que no mesmo soro o método de ELISA detectou anticorpos desta doença até a título de 1/256;
10. Nanossensor composto de eletrodo impresso a base de nanoestruturas de carbono para leishmaniose visceral canina de acordo com a reivindicação 8, caracterizado por utilizar transdução preferencialmente eletroquímica, pelo compósito apresentar alta condutividade elétrica.

FIGURAS

Figura 1

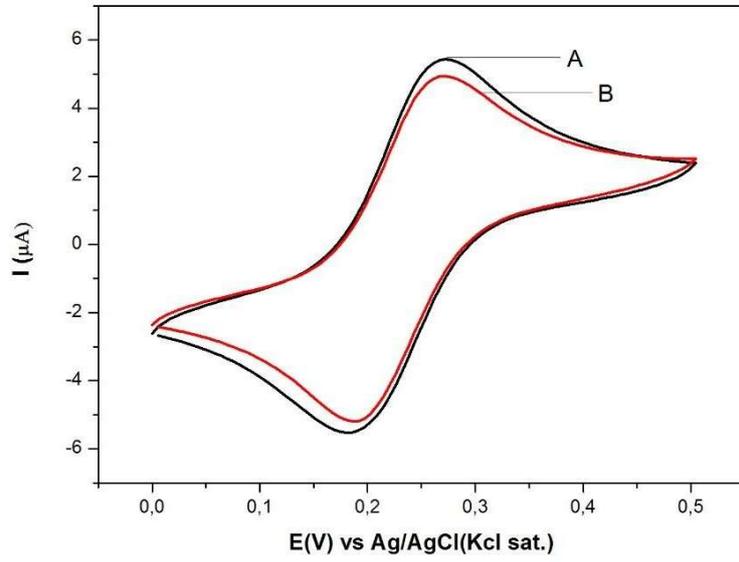


Figura 2

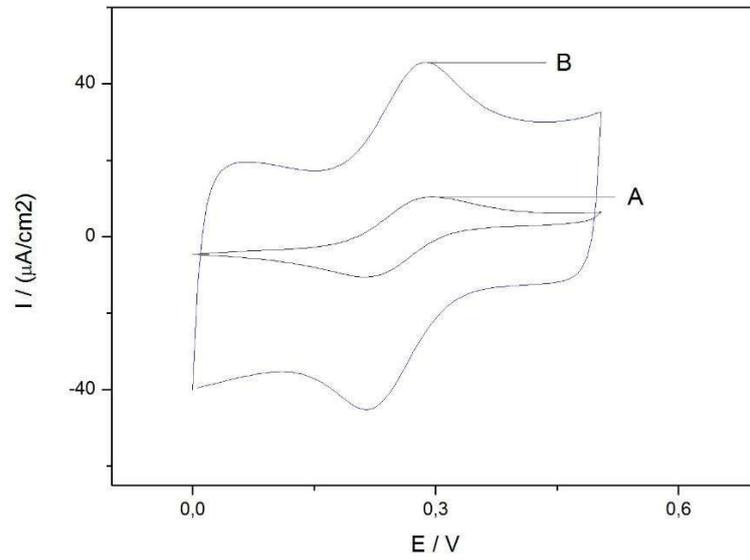


Figura 3

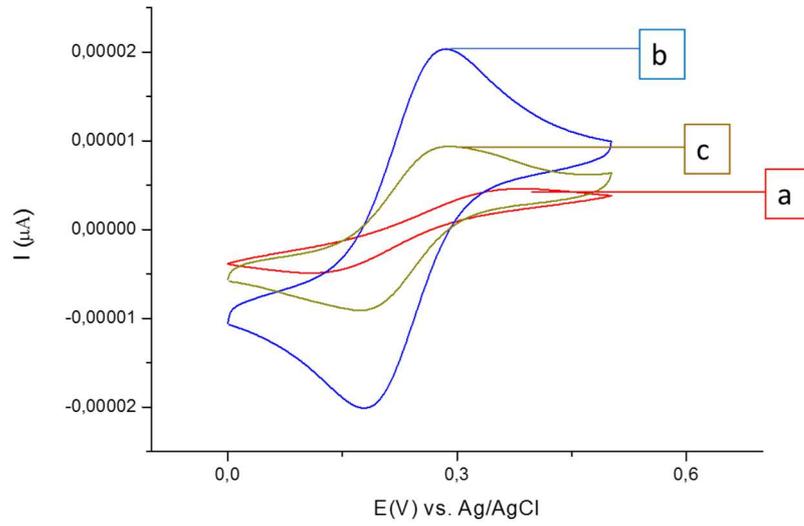


Figura 4

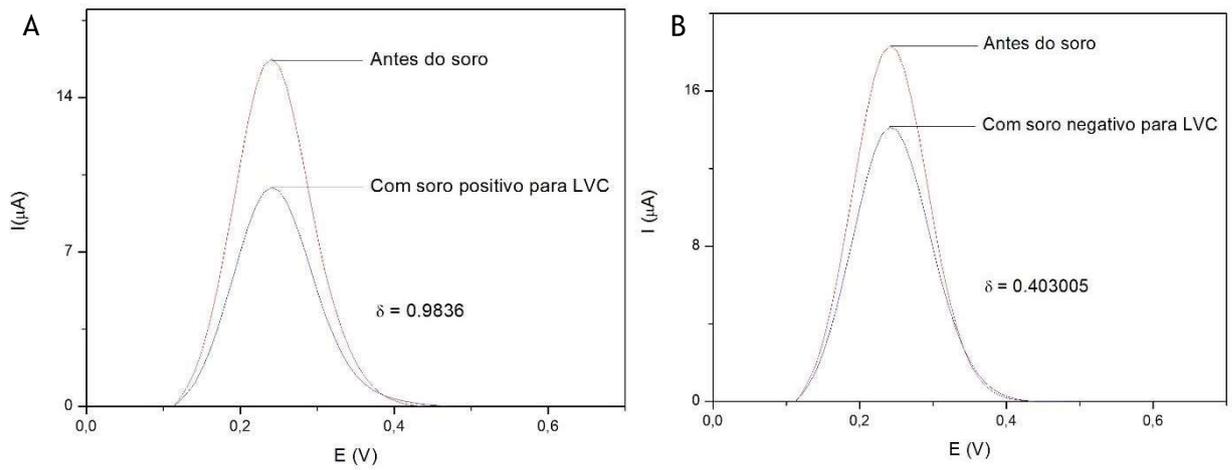


Figura 5

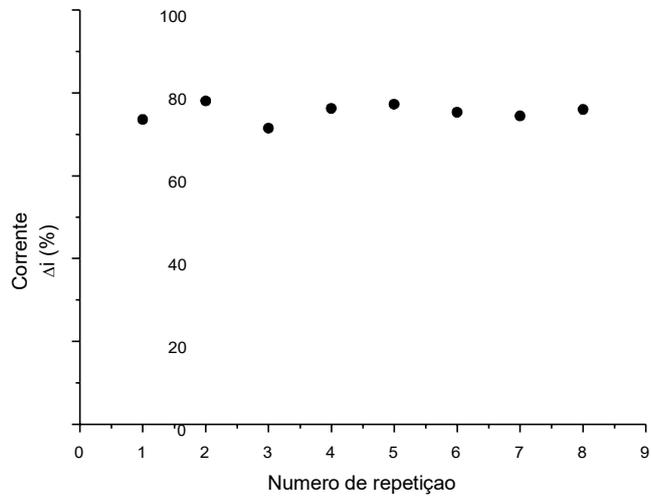


Figura 6

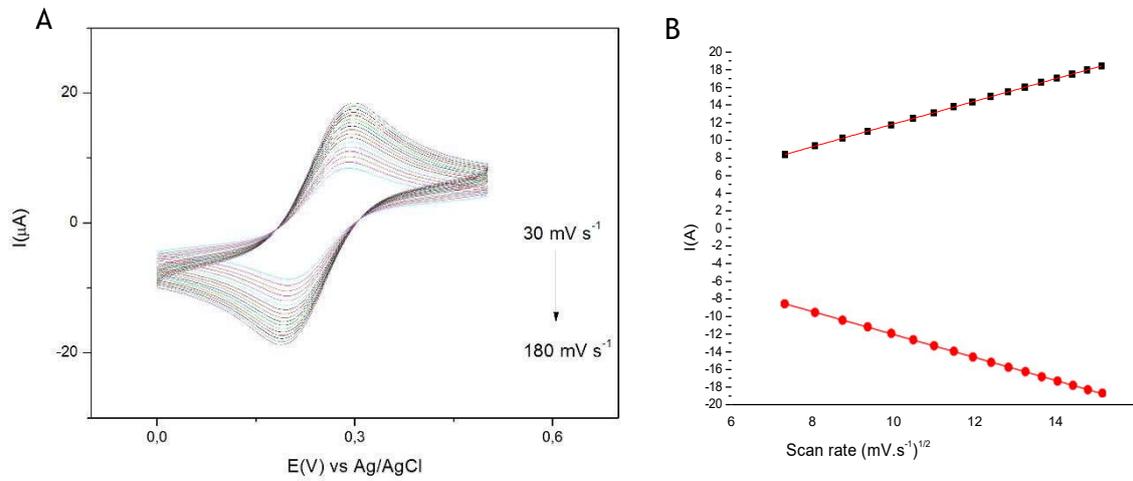


Figura 7

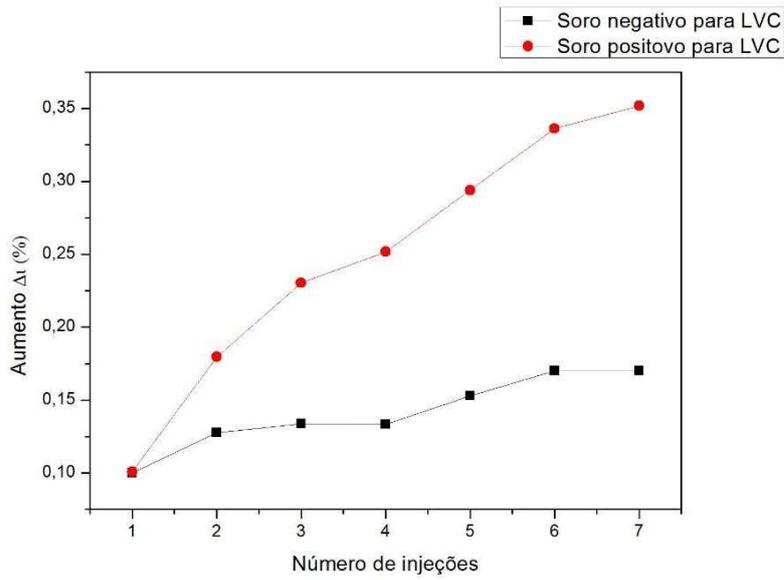


Figura 8

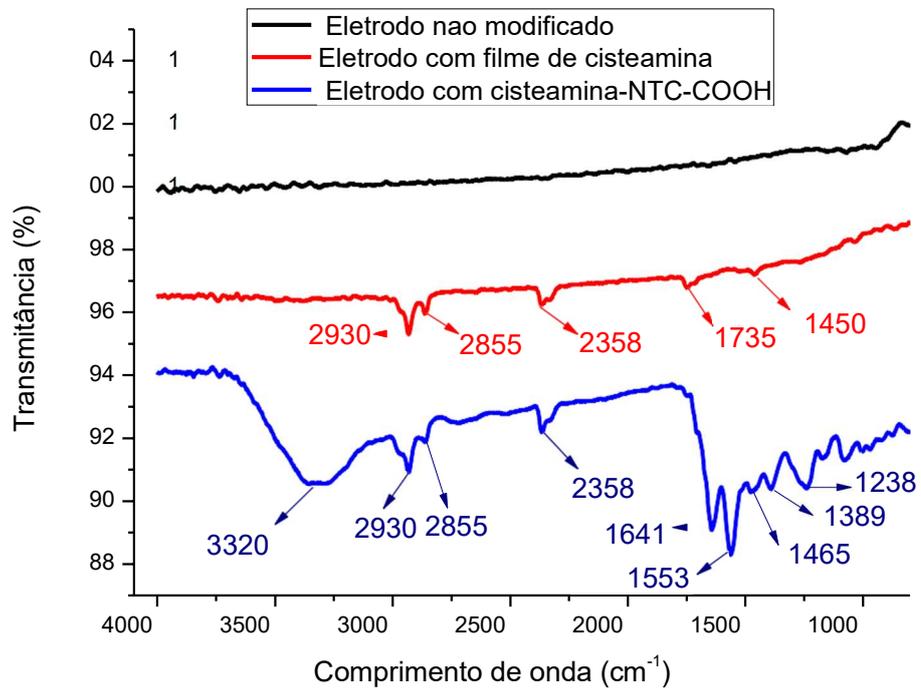
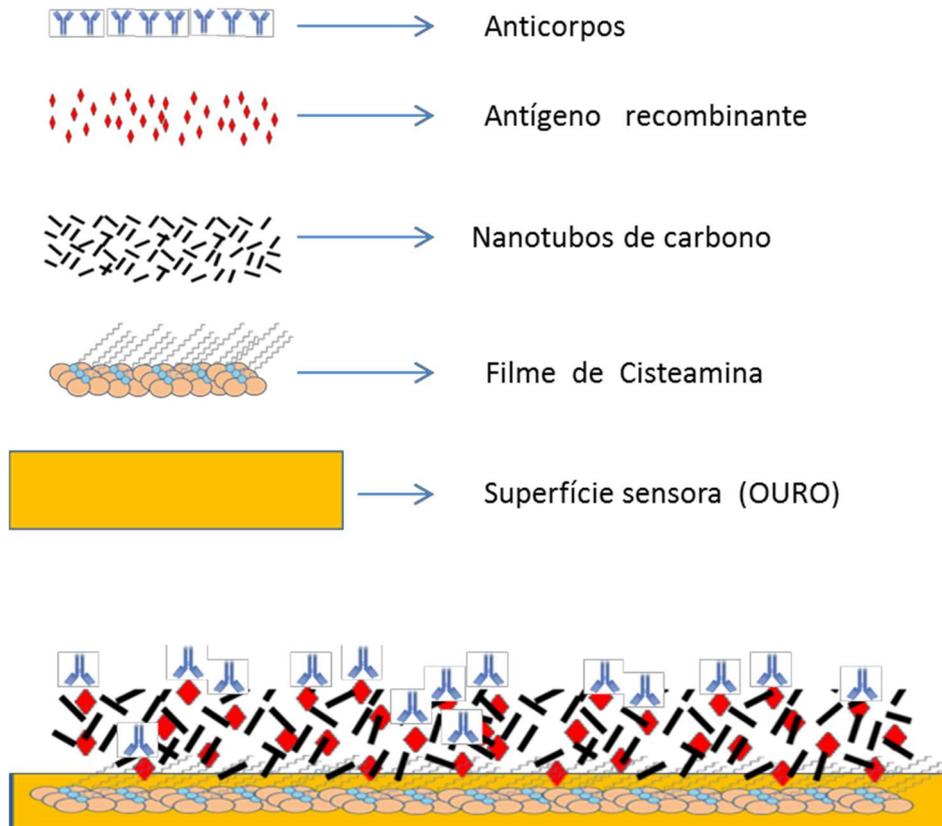


Figura 9



RESUMO

“NANOSSENSOR COMPOSTO DE ELETRODO IMPRESSO A BASE DE NANOESTRUTURAS DE CARBONO PARA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA”

A presente invenção trata de sensor nanoestruturado, capaz de detectar títulos de anticorpos inferiores aos níveis detectáveis pelo ELISA e com especificidade semelhante a este método. Pelas suas características de fácil execução, baixo custo e elevadas sensibilidade e especificidade, este nanossensor pode ser adotado como método diagnóstico de escolha para a realização de inquéritos epidemiológicos de LVC. Sua matriz pode ser empregada na detecção de outras biomoléculas que se assemelhem quimicamente às proteínas utilizadas como elemento de reconhecimento biológico neste sensor.

O presente nanossensor foi estruturado em eletrodo de tinta de ouro no qual foram depositadas monocamadas auto-organizadas de filmes de alcanotióis, por meio da ligação entre Au-S, revestidos com nanoestruturas de alótropos de carbono contendo grupos carboxílicos para ligações amida com proteínas e em seguida ligados os antígenos recombinantes. Mostrou-se estável quando submetido a repetidos ciclos sob diferentes velocidades de varredura e apresentou boa reprodutibilidade, com um coeficiente de variação de 3,02% e especificidade semelhante ao ELISA.

5 CONCLUSÃO

O nanossensor desenvolvido foi estruturado em eletrodo de tinta de ouro, no qual foram depositadas monocamadas auto-organizadas de filmes de alcanotióis, por meio da ligação entre Au-S, revestidos com nanoestruturas de alótropos de carbono contendo grupos carboxílicos para ligações amida com proteínas e, em seguida, ligados os antígenos recombinantes produzidos a partir de *Leishmania chagasi*. Sua matriz pode ser empregada na detecção de outras biomoléculas que se assemelhem quimicamente às proteínas utilizadas como elemento de reconhecimento biológico neste sensor.

O nanossensor demonstrou estabilidade quando submetido a repetidos cíclicos sob diferentes velocidades de varredura e apresentou boa reprodutibilidade, com um coeficiente de variação de 3,02% e especificidade semelhante ao ELISA.

Este nanossensor mostrou-se capaz de detectar títulos de anticorpos inferiores aos níveis detectáveis pelo ELISA e com especificidade semelhante a este método. Em testes preliminares demonstrou a capacidade de detectar anticorpos em amostras de cães infectados por *Leishmania* com título de detecção de 1/512, enquanto que na mesma amostra, através do método de ELISA, o título de anticorpos alcançado foi de 1/256.

Pelas suas características de fácil execução, baixo custo e elevadas sensibilidade e especificidade, este nanossensor pode ser empregado em método de diagnóstico de escolha para a realização de inquéritos epidemiológicos de LVC. Sua matriz pode ser empregada na detecção de outras biomoléculas que se assemelhem quimicamente às proteínas utilizadas como elemento de reconhecimento biológico neste sensor.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 576 p.
- ALBAREDA-SIRVENT, M.; MERKOÇI, A.; ALEGRET, S. Configurations used in the design of screen-printed enzymatic biosensors. A review. **Sens. Actuators B: Chem.**, v. 69, n. 1-2, p. 153-163, 2000.
- ALBERTS, B. *et al.* **Fundamentos da biologia celular**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.
- ALVES, C. F. *et al.* American Tegumentary Leishmaniasis: effectiveness of an immunohistochemical protocol for the detection of Leishmania in skin. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, n. 5, e63343, 2013.
- ALVES, W. A.; BEVILACQUA, P. D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993–1997. **Cad. Saúde Pública**, v. 20, n. 1, p. 259-265, 2004.
- ANTINORI, S. *et al.* Leishmaniasis among organ transplant recipients. **Lancet Infect. Dis.**, Nova York, v. 8, n. 3, p. 191-199, 2008.
- ASHFORD, R. W. Leishmaniasis reservoir and their significance in control. **Clin. Dermatol.**, Philadelphia, v. 14, n. 5, p. 523-532, 1996.
- BADARÓ, R. *et al.* rK39: a clone antigen Leishmania chagasi that predicts active visceral leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v. 173, n. 3, p. 758-762, 1996.
- BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications**. Nova York: Wiley, 2010. 856 p.
- BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications**. 2. ed. Nova York: Wiley, 2001. 864 p.
- BARRETO, M. L. *et al.* Successes and failures in the control of infectious diseases in Brazil: social and environmental context, policies, interventions, and research needs. **Lancet**, Londres, v. 377, n. 9780, p. 1877-1889, 2011.
- BASIUK, V. A.; BASIUK, E. V. Chemical Derivatization of Carbon Nanotube Tips. *In*: NALWA, H. S. **Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology**. Nova York: American Scientific Publisher, 2004.
- BASSET, D. *et al.* Visceral leishmaniasis in organ transplant recipients: 11 new cases and a review of the literature. **Microbes Infect.**, Paris, v. 7, n. 13, p. 1370-1375, 2005.
- BAUZER, L. G. *et al.* Lutzomyia longipalpis in Brazil: a complex or a single species? A mini-review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102, n. 1, p. 1-12, 2007.
- BERN, C.; MAGUIRE, J. H.; ALVAR, J. Complexities of Assessing the Disease Burden Attributable to Leishmaniasis. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, San Francisco, v. 2, n. 10, e313, 2008.

BERTÓK, T. *et al.* Electrochemical lectin based biosensors as a label free tool in glycomics. **Microchim. Acta**, Viena, v. 180, n. 1, p. 1-13, 2013.

BOUSSAA, S. *et al.* Seasonal fluctuations of phlebotomine sand fly populations (Diptera: Psychodidae) in the urban area of Marrakech, Morocco. **Acta Trop.**, Basileia, v. 95, n. 2, p. 86-91, 2005.

BRETT, C. M. A.; BRETT, A. M. O. **Electrochemistry: Principles, Methods, and Applications**. Nova York: Oxford University Press, 1993. 464 p.

CABRAL, D. G. A **Desenvolvimento de biossensor eletroquímico para detecção de anticorpos dirigidos contra proteína do nucleocapsídeo vírico da Hepatite B**. 2014. 51 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular Aplicada) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco, Recife, 2014.

CAVALCANTI, I. T. *et al.* A disposable chitosan-modified carbon fiber electrode for dengue virus envelope protein detection. **Talanta**, Amsterdam, v. 91, p. 41-46, 2012.

CHAMBERS, J. P. *et al.* Biosensor recognition elements. **Curr. Issues Mol. Biol.**, Wymondham (UK), v. 10, n. 1-2, p. 1-12, 2008.

CHAPPUIS, F. *et al.* Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nat. Rev. Microbiol.**, Londres, v. 5, n. 11, p. 873-882, 2007.

CLABORN, D. M. **Leishmaniasis: trends in epidemiology, diagnosis and treatment**. Rijeka: InTech, 2014.

CLEMENTE, W. T. *et al.* Visceral leishmaniasis in liver transplant recipients from an endemic area. **Transplantation**, Baltimore, v. 91, n. 7, p. 806-808, 2011.

COSTA, C. H.; MIRANDA-SANTOS, I. K. F. Aircraft and risk of importing a new vector of visceral leishmaniasis. **Emerg. Infect. Dis.**, Atlanta, v. 17, n. 7, p. 1333-1334, 2011.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 27, n. 5, p. 305-318, 2004.

DIAS, A. C. M. S. *et al.* A sensor tip based on carbono nanotube-ink printed electrode for the dengue virus NS1 protein. **Biosens. Bioelectron.**, Londres, v. 44, p. 216-221, 2013.

DUJARDIN, J. C. Risk factors in the spread of leishmaniasis: towards integrated monitoring? **Trends Parasitol.**, Oxford, v. 22, n. 1, p. 4-6, 2005.

DUTRA, R. F. *et al.* Surface plasmon resonance immunosensor for human cardiac troponin T based on self-assembled monolayer. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Oxford, v. 43, n. 5, p. 1744-1750, 2007.

FURTADO, R. F. *et al.* **Aplicações de Biossensores na Análise da Qualidade de Alimentos**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2008. v. 117.

EVANS, T. G. *et al.* Canine visceral leishmaniasis in northeast Brazil: assessment of serodiagnostic methods. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 42, n. 2, p. 118-123, 1990.

FANJUL-BOLADO, P. *et al.* Electrochemical characterization of screen-printed and conventional carbon paste electrodes. **Electrochim. Acta**, Oxford, v. 53, n. 10, 3635-3642, 2008.

FANJUL-BOLADO, P. *et al.* Manufacture and evaluation of carbon nanotube modified screen-printed electrodes as electrochemical tools. **Talanta**, Amsterdam, v. 74, n. 3, p. 427-433, 2007.

FAUSTO, E.; BEAVER, J.; JUNG, R. **Animal agents and vectors of human diseases**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1973.

FREIRE, R. S.; PESSOA, C. A.; KUBOTA, L. T. Emprego de monocamadas auto-organizadas no desenvolvimento de sensores eletroquímicos. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 26, n. 3, p. 381-389, 2003.

GAUA, V. *et al.* Electrochemical molecular analysis without nucleic acid amplification. **Methods**, San Diego, v. 37, n. 1, p. 73-83, 2005.

GONZALEZ, C. *et al.* Climate change and risk of leishmaniasis in North America: predictions from ecological niche models of vector and reservoir species. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, San Francisco, v. 4, n. 1, e585, 2010.

GOODING, J. J. Nanostructuring electrodes with carbon nanotubes: A review on electrochemistry and applications for sensing. **Electrochim. Acta**, Oxford, v. 50, n. 15, p. 3049-3060, 2005.

GOPINATH, S. C. B. *et al.* Current aspects in immunosensors. **Biosens. Bioelectron.**, Londres, v. 57, p. 292-302, 2014.

HARHAY, M. O. *et al.* Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. **Trends Parasitol.**, Oxford, v. 27, n. 9, p. 403-409, 2011.

HARITH, A. E. *et al.* Evaluation of a newly developed direct agglutination test (DAT) for serodiagnosis and sero-epidemiological studies of visceral leishmaniasis: comparison with IFAT and ELISA. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, Londres, v. 81, n. 4, p. 603-606, 1987.

HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2005. 876 p.

HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. **Princípios de Análise Instrumental**. 6. ed. São Paulo: Bookman, 2009. 1056 p.

IJJIMA, S. Helical microtubules of graphitic carbon. **Nature**, Londres, v. 354, 56-58, 1991.

JAFFE, C. L.; ZALIS, M. Use of purified parasite proteins from *Leishmania donovani* for the rapid serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v. 157, n. 6, p. 1212-1220, 1988.

JANEWAY JUNIOR, C. A. *et al.* **Imunologia: o sistema imune na saúde e na doença**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007. 848 p.

JERONIMO, S. M. B. *et al.* An emerging peri-urban pattern of infection with *Leishmania chagasi*, the protozoan causing visceral leishmaniasis in northeast Brazil. **Scand. J. Infect.**

Dis., Estocolmo, v. 36, n. 6-7, p. 443-449, 2004.

Jl, X. B. *et al.* Understanding the physicoelectrochemical properties of carbon nanotubes: current state of the art. **Electroanalysis**, Nova York, v. 22, n. 1, p. 7-19, 2010.

KATZ, E.; WILLNER, I. Biomolecule-functionalized carbon nanotubes: applications in nanobioelectronics. **Chemphyschem**, Weinheim, v. 5, n. 8, p. 1084-1104, 2004.

KAVAN, L.; DUNSCH, L.; KATAURA, H. Electrochemical tuning of electronic structure of carbon nanotubes and fullerene peapods. **Carbon**, Pennsylvania, v. 42, n. 5-6, p. 1011- 1019, 2004.

KISSINGER, P. T. Biosensors - a perspective. **Biosens. Bioelectron.**, Londres, v. 20, n. 12, p. 2512-2516, 2005.

KLAASSEN, C. D. (ed.). **Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons**. 6.ed. Nova York: McGraw-Hill, 2001. 1236 p.

LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the ecoepidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, n. 8, p. 811-827, 2005.

LEAL, C. R. B. Métodos disponíveis e possíveis para o diagnóstico da leishmaniose visceral americana canina. **BEPA, Bol. Epidemiol. Paul.**, São Paulo, v. 6, n. 69, p. 14-18, 2009.

LEE, J-O. *et al.* Aptamers as molecular recognition elements for electrical nanobiosensors. **Anal. Bioanal. Chem.**, Heidelberg, v. 390, n. 4, p. 1023-1032, 2008.

LI, J. Applications: Biosensors. *In*: MEYYAPPAN, M. **Carbon Nanotubes: Science and Applications**. Nova York: CRC Press, 2005. 310 p.

LI, L. *et al.* Photolithographic boronate affinity molecular imprinting: a general and facile approach for glycoprotein imprinting. **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.**, Weinheim, v. 52, n. 29, p. 7451-7454, 2013.

LIN, Y. *et al.* Biosensor based on carbon nanotubes. *In*: NALWA, H. S. **Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology**. Nova York: American Scientific Publisher, 2004.

LIU, J.; CAO, Z.; LU, Y. Functional Nucleic Acid Sensors. **Chem. Rev.**, Easton, v. 109, n. 5, p. 1948-1998, 2009.

LOMBARDI, M. C. *et al.* Diagnosis of *Leishmania infantum* infection by Polymerase Chain Reaction in wild mammals. **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v. 34, n. 12, p. 1243-1246, 2014.

LOWINSOHN, D.; BERTOTTI, M. Sensores eletroquímicos: considerações sobre mecanismos de funcionamento e aplicações no monitoramento de espécies químicas em ambientes microscópicos. **Quím. Nova**, v. 29, n. 6, p. 1318-1325, 2006.

MACHADO, C. J. S. **Ciências, políticas públicas e sociedade sustentável**. Rio de Janeiro: E-papers, 2012.

MACHADO, C. J. S. **Desenvolvimento sustentável para o Antropoceno**. Rio de Janeiro: E-Papers, 2014.

MAIA, C.; CAMPINO, L. Can domestic cats be considered reservoir hosts of zoonotic leishmaniasis? **Trends Parasitol.**, Oxford, v. 27, n. 8, p. 341-344, 2011.

MALHOTRA, B. D.; CHAUBEY, A. Biosensors for clinical diagnostics industry. **Sens. Actuators B Chem.**, Lausanne, v. 91, n. 1-3, p. 117-127, 2003.

MEHRVAR, M.; ABDI, M. Recent Developments, characteristics, and potential applications of electrochemical biosensors. **Anal. Sci.**, Tokio, v. 20, n. 8, p. 1113-1126, 2004.

MENEZES, C. E. L. **Desenvolvimento de nanoimunossensor capacitado interdigitado para detecção de anticorpos contra o nucleocapsídeo do vírus da hepatite B**. 2014. 75 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014.

MERKOÇI, A. Carbon nanotubes in analytical sciences. **Microchim. Acta**, Viena, v. 152, n. 3-4, p. 157-174, 2006.

MICHALSKY, E. M. *et al.* Phlebotominae distribution in Janaúba, an area of transmission for visceral leishmaniasis in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, n. 1, p. 56-61, 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Situação epidemiológica da Leishmaniose Visceral. Dados. **gov.br**, Brasília, 2015. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/726-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/leishmaniose-visceral-lv/11334-situacao-epidemiologica-dados>. Acesso em: 10 jun. 2016.

AMIN, E. R. *et al.* Serodiagnosis of Sudanese visceral and mucosal leishmaniasis: comparison of ELISA--immunofluorescence and indirect haemagglutination. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, Londres, v. 80, n. 2, p. 271-274, 1986.

MONDAL, S.; BHATTACHARYA, P.; ALI, N. Current diagnosis and treatment of visceral leishmaniasis. **Expert Rev. Anti Infect. Ther.**, Londres, v. 8, n. 8, p. 919-944, 2010.

MOREIRA, C. S. *et al.* **Biosensores: Tecnologia e Aplicações**. In: CONGRESSO NORTE-NORDESTE DE PESQUISA E INOVAÇÃO, 5., 2010, Maceió. **Anais [...]**. Brasília: Ministério da Educação, 2010.

MUJAHIND, A.; IQBAL, N.; AFZAL, A. Bioimprinting strategies: From soft lithography to biomimetic sensor and beyond. **Biotechnol. Adv.**, Oxford, v. 31, n. 8, p. 1435-1447, 2013.

NASCIMENTO, E. L. T. *et al.* Forum: geographic spread and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. Postscript: new challenges in the epidemiology of *Leishmania chagasi* infection. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 12, p. 2964-2967, 2008.

NASCIMENTO, V. B.; ANGNES, L. Eletrodos fabricados por “silk-screen”. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 21, n. 5, p. 614-629, 1998.

O’DEA, J.; WOJCIECHOWSKI, M.; OSTERYOUNG, J. Square wave voltammetry at electrodes having a small dimension. **Anal. Chem.**, Washington DC, v. 57, n. 4, p. 954-955,

1985.

OSTERYOUNG, J.; OSTERYOUNG, R. Square wave voltammetry. **Anal. Chem.**, Washington DC, v. 57, n. 1, p. 101-110, 1985.

OZENSOY, S. *et al.* Serodiagnosis and epidemiology of visceral leishmaniasis in Turkey. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 59, n. 3, p. 363-369, 1998.

PACHECO, W. F. *et al.* Voltametrias: Uma Breve Revisão Sobre os Conceitos. **Rev. Virtual Quím.**, Niterói, v. 5, n. 4, p. 516-537, 2013.

PASSOS, S. *et al.* Recombinant leishmania antigens for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, Washington DC, v. 12, n. 10, 1164-1167, 2005.

PATHAK, P.; KATIYAR, V. K.; GIRI, S. Cancer Research-Nanoparticles, Nanobiosensors and Their Use in Cancer Research. **J. Nanotechnol.**, Nova York, v. 3, p. 1-4, 2007.

PERUMAL, V.; HASHIM, U. Advances in biosensors: Principle, architecture and applications. **J. Appl. Biomed.**, České Budějovice, v. 12, n. 1, p. 1-15, 2014.

PESSOA JUNIOR, A.; KILIKIAN, B. V. **Purificação de produtos biotecnológicos**. São Paulo: Manole, 2005.

QUINNELL, R. J.; COURTENAY, O. Transmission reservoir host of zoonotic visceral leishmaniasis. **Parasitology**, Londres, v. 136, n. 14, p. 1915-1934, 2009.

RAMÍREZ, N. B.; SALGADO, A. M.; VALDMAN, B. The evolution and developments of immunosensors for health and environmental monitoring: problems and perspectives. **Braz. J. Chem. Eng.**, São Paulo, v. 26, n. 2, p. 227-249, 2009.

RAMOS-JESUS, J. *et al.* A piezoelectric immunosensor for *Leishmania chagasi* antibodies in canine serum. **Anal. Bioanal. Chem.**, Heidelberg, v. 401, n. 3, p. 917-925, 2011.

RANDLES, J. E. B. A cathode ray polarograph. Part II The current-voltage curves. **Transactions of the Faraday Society**, Cambridge, v. 44, n. 5, 327-338, 1948.

READY, P. D. Leishmaniasis emergence and climate change. **Rev. Sci. Tech.**, Paris, v. 27, n. 2, p. 399-412, 2008.

READY, P. D. Leishmaniasis emergence in Europe. **Euro Surveill.**, Saint-Maurice, v. 15, n. 10, 19505, 2010.

RECHNITZ, G. A. Biosensors: An overview. **J. Clin. Lab. Anal.**, Nova York, v. 1, n. 3, p. 308-312, 1987.

RECHNITZ, G. A.; NAKAMURA, R. M. Future of biosensors in the clinical laboratory. **J. Clin. Lab. Anal.**, Nova York, v. 2, n. 3, p. 131-133, 1988.

RICCI, F.; ADORNETTO, G., PALLESCI, G. A review of experimental aspects of electrochemical immunosensors. **Electrochim. Acta**, Oxford, v. 84, p. 74-83, 2012.

RIVAS, G. A. *et al.* Carbon nanotubes for electrochemical biosensing. **Talanta**, Amsterdam,

v. 74, n. 3, p. 291-307, 2007.

SANCHEZ-GARCIA, L. *et al.* Sand flies naturally infected by *Leishmania (L.) mexicana* in the peri-urban area of Chetumal city, Quintana Roo, Mexico. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, Londres, v. 104, N. 6, p. 406-411, 2010.

SANTOS, J. C. C. **Imobilização da enzima glicose oxidase em filmes nanoestruturados para aplicação em biossensores.** 2012. 94 f. Dissertação (Mestrado em Física Básica) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

SILVA JUNIOR, J. G. **Cromatografia de Proteínas: Guia teórico e prático.** Rio de Janeiro: Interciência, 2004.

SILVA, B. V. M. *et al.* Disposable immunosensor for human cardiac troponin T based on streptavidin-microsphere modified screen-printed electrode. **Biosens. Bioelectron.**, Oxford, v. 26, n. 3, p. 1062-1067, 2010.

SKOOG, D. A. *et al.* **Fundamentos de Química Analítica.** 8. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2008. 999 p.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de Análise Instrumental.** 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. 836 p.

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

SOUZA, D. *et al.* Voltametria de onda quadrada. Segunda parte: aplicações. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 790-797, 2004.

SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: aspectos teóricos. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 26, n. 1, p. 81-89, 2003.

SRIVASTAVA, P. *et al.* Diagnosis of Indian visceral leishmaniasis by nucleic acid detection using PCR. **PLoS One**, San Francisco, v. 6, n. 4, e19304, 2011.

STUART, B. **Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications.** Chichester: John Wiley & Sons, 2004.

TALEAT, Z.; KHOSHROO, A.; MAZLOUM-ARDAKANI, M. Screen-printed electrode for biosensing: a review (2008-20013). **Microchim. Acta**, Viena, v. 181, n. 9-10, p. 865- 891, 2014.

TARALLO, V. D. *et al.* Phlebotomine sand fly population dynamics in a leishmaniasis endemic peri-urban area in southern Italy. **Acta Trop.**, Basel, v. 116, n. 3, p. 227-234, 2010.

THE WORLD OF NANOSCIENCE. Nanotubes and Carbon Fibers. [S. l.], [201?]. Disponível em: <http://worldofnanoscience.weebly.com/nanotube--carbon-fiber-overview.html>. Acesso em: 18 dez. 2016.

THÉVENOT, D. R. *et al.* Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. **Biosens. Bioelectron.**, Oxford, v. 16, n. 1-2, p. 121-131, 2001.

VELASCO-GARCIA, M. N. Optical biosensors for probing at the cellular level: A review of recent progress and future prospects. **Semin. Cell Dev. Biol.**, Londres, v. 20, n. 1, p. 27-33, 2009.

VEROUX, M. *et al.* Visceral leishmaniasis in the early posttransplant period after kidney transplantation: clinical features and therapeutic management. **Transpl. Infect. Dis.**, Copenhagen, v. 12, n. 5, p. 387-391, 2010.

WANG, G. *et al.* A living cell quartz crystal microbalance biosensor for continuous monitoring of cytotoxic responses of macrophages to single-walled carbon nanotubes. **Part. Fibre Toxicol.**, Londres, v. 8, p. 4, 2011.

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

WANG, J.; LIN, Y.H. Functionalized carbon nanotubes and nanofibers for biosensing applications. **Trends Analyt. Chem.**, Amsterdam, v. 27, n. 7, p. 619-626, 2008.

WANG, Y. *et al.* Electrochemical sensors for clinic analysis. **Sensors**, Basel, v. 8, n. 4, p. 2043-2081, 2008.

WERNECK, G. L. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Brasil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 26, n. 4, p. 644-645, 2010.

WILDGOOSE, G. G. *et al.* Chemically modified carbon nanotubes for use in electroanalysis. **Microchim. Acta**, Viena, v. 152, n. 3-4, p. 187-214, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leishmaniasis: Magnitude of the problem. **Who**, [S. l.], 2010. Disponível em: http://www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/burden_magnitude/en/index.html. Acesso em: 4 maio 2016.

FERREIRA, A.; YAMANAKA, H. Microscopia de força atômica aplicada em imunoenaios. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 137-142, 2006.

YUAN, X. *et al.* **Electrochemical Impedance Spectroscopy in PEM Fuel Cells: Fundamentals and Applications**. New York: Springer London, 2010. 420 p.

ZHAO, Q.; GAN, Z.; ZHUANG, Q. Electrochemical sensors based on carbon nanotubes. **Electroanalysis**, Nova York, v. 14, n. 23, p. 1609-1613, 2002.

ZHOU, T. L. *et al.* Influence of carboxylic functionalization of MWCNTs on the thermal properties of MWCNTs/DGEBA/EMI-2,4 nanocomposites. **Compos. Part A Appl. Sci. Manuf.**, Oxford, v. 40, n. 11, p. 1792-1797, 2009.