



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO -UFMA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIAS - CCET
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CURSO DE QUÍMICA LICENCIATURA

SAKAE YOTSUMOTO NETO

DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSSENSOR PARA LEISHMANIA INFANTUM
EXPLORANDO RESSONÂNCIA DE PLÁSMON DE SUPERFÍCIE

São Luís

2017

SAKAE YOTSUMOTO NETO

**DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSENSOR PARA LEISHMANIA INFANTUM
EXPLORANDO RESSONÂNCIA DE PLÁSMON DE SUPERFÍCIE**

Monografia apresentada à coordenação do curso de Química Licenciatura da Universidade Federal do Maranhão - UFMA, como requisito necessário para a obtenção da graduação em Química Licenciatura.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Santos Damos
Universidade Federal do Maranhão

SÃO LUÍS

2017

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Yotsumoto Neto, Sakae.

DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSSENSOR PARA LEISHMANIA
INFANTUM EXPLORANDO RESSONÂNCIA DE PLÁSMON DE SUPERFÍCIE /
Sakae Yotsumoto Neto. - 2017.

63 f.

Orientador(a): Flávio Santos Damos.

Monografia (Graduação) - Curso de Química, Universidade
Federal do Maranhão, São Luís, 2017.

1. Imunossensores. 2. Leishmaniose visceral canina.
3. Monocamadas auto-organizadas. 4. Ressonância de
plásmos de superfície. I. Damos, Flávio Santos. II.
Título.

SAKAE YOTSUMOTO NETO

**DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSSENSOR PARA LEISHMANIA
INFANTUM EXPLORANDO RESSONÂNCIA DE PLÁSMON DE SUPERFÍCIE**

Monografia apresentada à coordenação do curso de Química Licenciatura da Universidade Federal do Maranhão - UFMA, como requisito necessário para a obtenção da graduação em Química Licenciatura.

Aprovada em: 17/07/17

BANCA EXAMINADORA

Almeida

Profa. Dra. ALDALEA LOPES BRANDES MARQUES

Universidade Federal do Maranhão
Membro

Bezerra

Prof. Dr. CICERO WELLINGTON BRITO BEZERRA

Universidade Federal do Maranhão
Membro

Santos Damos

Prof. Dr. FLAVIO SANTOS DAMOS

Universidade Federal do Maranhão
Orientador

“Somente o conhecimento não é suficiente. Somente quando o conhecimento alia-se a sabedoria é que uma pessoa pode atingir a vitória na vida. Sem sabedoria, não se pode distinguir as pessoas boas ou más.” - Daisaku Ikeda

Ao meu avô Sakae Yotsumoto (in memoriam)

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Flávio Santos Damos, pela sua excelente orientação durante a realização desse trabalho, pela confiança depositada, pela sua amizade e ensinamentos valiosos que me fizeram evoluir como pesquisador.

À Profa. Dra. Rita Luz pelas contribuições significativas e suporte fornecido no decorrer do desenvolvimento do trabalho.

Aos meus pais Toshio Yotsumoto e Tereza de Jesus P. N. Yotsumoto, pela dedicação e amor aos filhos e pela preocupação com a nossa educação.

Aos meus irmãos Kakuey Nunes Yotsumoto, Lhoichi Nunes Yotsumoto e Michika Nunes Yotsumoto, pelos conselhos, ajudas e incentivos na minha vida.

A minha família Yotsumoto, em especial ao meu primo José Reis Neto.

À minha namorada Nataliane Lima, pelo seu amor sincero, pela amizade e companheirismo dedicado a mim.

Aos meus colegas do Laboratório de Sensores, dispositivos e métodos analítico (LabS), que colaboraram direta ou indiretamente para conclusão desse trabalho.

Ao Dr. Dênio Emanuel Pires Souto e a Profa. Dra. Héliida Monteiro de Andrade pela colaboração, a qual foi essencial para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores do curso de Química Licenciatura da UFMA.

A todos os amigos e colegas adquiridos durante o curso, e a meus amigos e parceiro do dia a dia, em especial: Marcio, Nonato, Noboru, Junho Bento, André e Carlos Anderson.

E para todos que passaram e ainda estão presentes na minha vida e que contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho.

RESUMO

O presente trabalho descreve o desenvolvimento de um imunossensor para a detecção de anticorpos de anti-*Leishmania infantum* explorando a Ressonância Plásmons de Superfície (SPR) como sistema de transdução. O sensor foi produzido através da imobilização do antígeno de *Leishmania infantum* sobre a monocamada auto organizada (SAM) mista confeccionada a partir do ácido 11-mercaptoundecanóico (11-MUA) e do ácido 3-mercaptopropiônico (3-MPA). A SAM mista foi ativada por uma mistura contendo 100 mmol L⁻¹ do 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e 150 mmol L⁻¹ de N-hidroxisuccinimida (NHS). O imunossensor desenvolvido foi caracterizado eletroquimicamente por voltametria cíclica (VC), microscopia eletroquímica de varredura (SECM), dessorção redutiva (DR) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE). Adicionalmente, os efeitos da concentração do antígeno, tempo de imobilização e composição da SAM mista sobre a quantidade de antígenos imobilizados foram avaliados. Observou-se que o emprego de uma monocamada mista de 11-MUA e 3-MPA (na proporção de 1:1) para o recobrimento da superfície do eletrodo resultou em uma interação efetiva entre a SAM previamente ativada e os antígenos de *Leishmania infantum*. A investigação do processo de interação antígeno – anticorpo *Leishmania infantum* deixou evidente que o imunossensor confeccionado apresenta boa sensibilidade ($\Delta\theta_{\text{SPR}} / \text{m}^\circ = 15,20 + 10551 [\text{fator de diluição}]$), comportamento linear no intervalo de diluições compreendido entre 1:40 a 1:1280 e coeficiente de correlação de 0,998. A partir dos resultados obtidos, fica evidente que o imunossensor desenvolvido é sensível, rápido, simples e de fácil execução apresentando grande potencialidade para o diagnóstico sorológico de anticorpos *L. Infantum*.

Palavras-chave: Imunossensores, Monocamadas auto-organizadas, Ressonância de plásmons de superfície, Leishmaniose visceral canina.

ABSTRACT

This work describes the development of an immunosensor for the detection of anti-*Leishmania infantum* antibodies by exploiting Surface Plasmon Resonance (SPR) as a transduction system. The sensor was constructed by immobilizing the *Leishmania infantum* antigen on the mixed self-assembled monolayer (SAM) of 11-mercaptopundecanoic acid (11-MUA) and 3-mercaptopropionic acid (3-MPA). The mixed SAM was previously activated by a mixture containing 100 mmol L⁻¹ of 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) and 150 mmol L⁻¹ of N-hydroxysuccinimide (NHS). The proposed immunosensor was characterized by cyclic voltammetry (CV), reductive desorption (RD) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS). In addition, the effects of the antigen concentration, immobilization time and composition of the mixed SAM on the amount of immobilized antigens were evaluated by SPR. It was observed that the use of a mixed monolayer of 11-MUA and 3-MPA (1:1 ratio) resulted in an effective interaction between previously activated SAM and the antigens of *Leishmania infantum*. The investigation of the antigen-antibody interaction process by SPR resulted in a good sensitivity, linear response range for dilution factors from 1:1280 to 1:40 and a correlation coefficient of 0.998 ($\Delta\theta_{\text{SPR}} / \text{m}^\circ = 15.20 + 10551 [\text{dilution factor}]$). Thus, it is evident that the proposed immunosensor is sensitive, fast, simple and easy to perform, and promising for the serological diagnosis of *L. infantum* antibodies.

Keywords: Immunosensor, Self-assembled monolayer, Surface Plasmon Resonance, Visceral leishmaniasis.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - (a) Representação esquemática da configuração de Kretschmann para SPR. O dielétrico em contato com o metal possibilita a transferência ressonante de energia incidente para a OPS; (b) Curvas de refletância na ausência (Θ_{SPR1}) e presença (Θ_{SPR2}) de espécies na superfície do filme metálico; (c) Sensorgrama esquemático representativo entre o ângulo SPR (Θ_{SPR}) e tempo durante a interação de espécies com a superfície do filme metálico.....23
- Figura 2** - Esquema da formação de uma SAM sobre uma superfície de ouro.....25
- Figura 3** - Potenciostato/galvanostato da AUTOLAB[®] utilizado nas medidas eletroquímicas34
- Figura 4** - Célula eletroquímica utilizada nos testes VC e EIE.35
- Figura 5** - Espectrômetro de SPR da AUTOLAB[®] Springle utilizado para as medidas ópticas (1) e prisma de vidro em que se colocava o eletrodo de disco de ouro (2).35
- Figura 6** - Voltamograma cíclico obtido para a superfície de ouro após limpeza em solução 0,5 molL⁻¹ de H₂SO₄, com velocidade de varredura v de 50 mVs⁻¹, ΔE de -0,2 a 1,5 V vs Ag/AgCl.37
- Figura 7** - Voltamogramas cíclicos obtidos para o eletrodo limpo e modificado com monocamadas simples de 11-MUA e 3-MPA e com a monocamada mista de 11-MUA e 3-MPA na proporção 1:1 (v/v). As SAMs foram confeccionadas a partir de soluções de concentração 1mmolL⁻¹ e incubadas pelo período de 24 horas. Todos os VCs foram obtidos em 5 mmolL⁻¹ de ferricianeto de potássio em 0,1 molL⁻¹ de KCl a uma velocidade de varredura do potencial elétrico de 100 mVs⁻¹.....41
- Figura 8** - Estrutura do tiol 11-MUA.....42
- Figura 9** - Fórmula estrutural do tiol 3-MPA42
- Figura 10** - Curva de aproximação SECM obtida para substrato modificado com (A) SAM de MPA, (B) SAM de mista MPA-MUA e (C) SAM de MUA em KCl 0.1 molL⁻¹, contendo 1 mmolL⁻¹ [Fe(CN)₆]³⁻. A Tip foi polarizada em -0.2 V o substrato foi submetido a diferentes sobrepotenciais (1) 0.1, (2) 0.2, (3) 0.3, (4) 0.4 e (5) 0.5 V vs. Ag/AgCl. A figura inserida mostra o gráfico da constante de velocidade aparente vs sobrepotencial do substrato. A linha mostra os dados ajustados à teoria de Butler-Volmer.....45

Figura 11 - RD obtida através da técnica de VPD. Voltamogramas obtidos para as monocamadas simples e mistas de 11-MUA e 3-MPA, após 24 h de adsorção. Todos os voltamogramas foram obtidos em solução aquosa contendo $0,1 \text{ molL}^{-1}$ de KOH, v de 20 mVs^{-1} e ΔE de 0,1 a -1,3 V vs. Ag/AgCl. Anteriormente a realização das medidas a solução aquosa de KOH foi desaerada com gás nitrogênio durante aproximadamente 10 min.	47
Figura 12 - Diagramas de Nyquist para eletrodo de ouro modificado com SAM simples de 11-MUA, 3-MPA e mista dos mesmos tióis na proporção 1:1 frente à sonda redox hexacianoferrato de potássio 1 molL^{-1} em KCl $0,1 \text{ molL}^{-1}$. Espectroscopia de Impedância Eletroquímica feita em sistema aberto.	50
Figura 13 - Ângulo de fase em função do logaritmo da frequência para as SAMs de 11-MUA, 3-MPA e 11-MUA/3-MPA (1:1).	51
Figura 14 - Sensorgramas referentes ao deslocamento de ângulo de SPR para as SAMs (11-MUA, 3-MPA e 11-MUA:3-MPA) com antígenos de L. Infantum immobilizado sobre a superfície ativada com EDC-NHS.	52
Figura 15 - Sensorgramas referentes à interação do antígeno de L. Infantum com a SAM mista ativada a partir de soluções de diferentes concentrações do antígeno ($25; 50; 75$ e $100 \mu\text{g mL}^{-1}$). O deslocamento do ângulo de SPR ($\Delta\theta_{\text{SPR}}$) foi monitorado durante 5 minutos.	53
Figura 16 - Sensorgramas de SPR mostrando a injeção de soro canino positivo imediatamente após a regeneração utilizando 1%(v/v) SDS. Em anexo (a) curva de calibração da interação de diferentes diluições do soro canino positivo com o antígeno L. infantum immobilizado. (b) Comparação das injeções de soro canino positivo e negativo na diluição de 1:160 na superfície do imunossensor.	55

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Valores de intensidade de quantidade de carga (Q) e cobertura de superfície (Γ) obtidos para eletrodos de ouro modificados na concentração 1mmolL^{-1} de 11-MUA e 3-MPA, em solução $0,1\text{ molL}^{-1}$ de KOH e após tempo de interação de 24 horas. Os voltamogramas foram obtidos a uma velocidade de 20 mVs^{-1}48

LISTA DE ABREVIATURAS

AET	2-aminoetanotiol
Au	Sítio de adsorção ou superfície do ouro
AuNP	Nanopartícula de ouro
BSA	Albumina de Soro Bovino
C	Concentração molL ⁻¹
c	Coulombs
CYS	Cisteína
DAT	Teste de Aglutinação Direta
DRS	Deposição sob Regime de Subtensão
ΔE	Intervalo de potencial
$\Delta\theta_{SPR}$	Variação de ângulo de SPR
E	Potencial em volts (V)
ECS	Eletrodo de calomelano saturado
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
EIE	Espectroscopia de Impedância Eletroquímica
ELISA	Ensaio imunoenzimático
F	Constante de Faraday
k_{app}	Constante de transferência eletrônica heterogênea aparente
k_{OPS}	Vetor onda da onda de Plásmons de superfície ou constante de propagação da onda de plásmons de superfície
$K_3[Fe(CN)_6]$	Hexacianoferrato(III) de potássio
LC	Leishmaniose Cutânea
LD	Limite de detecção
LMC	Leishmaniose Mucocutânea ou Leishmaniose mucosacutânea
LQ	Limite de quantificação
LV	Leishmaniose Visceral
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
λ	Comprimento de onda da luz incidente e da onda de plásmons de superfície
Mda	Miligras de ângulo
MÊS	Ácido 2-mercaptoetano-sulfônico

3-MPA	Ácido 3-Mercaptopropiônico
11-MUA	Ácido 11-Mercaptoundecanóico
n	Número de elétrons
NHS	N-hidroxisuccinimida
OCP	Potencial de circuito aberto
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPS	Ondas de plásmons de superfície
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação em Cadeia Polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
Q	Carga associada com a redução de espécies na superfície
QCM	Microbalança de Cristal de Quartzo
RD	Redução Dessortiva ou Dessorção Redutiva
R_{et}	Resistência a transferência eletrônica
RG	Relação entre o raio parte isolante com a parte condutora do microelétrodo
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
R_s	Resistência da Solução
SAMs	Monocamadas Auto-Organizadas
SECM	Microscopia Eletroquímica de Varredura
SPR	Ressonância Plásmons de Superfície
Γ	Cobertura de superfície total (número de moléculas por área)
θ	Ângulo de incidência de luz
θ_{SPR}	Ângulo de SPR crítico ou ângulo de SPR
UV	Radiação ultra violeta
v	Velocidade de varredura
VC	Voltametria cíclica
VPD	Voltametria de pulso diferencial
W	Impedância de Waburg

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Leishmaniose	16
1.2	Biossensores	18
1.2.1	Biossensores biocatalíticos.....	19
1.2.2	Biossensores de afinidade	19
1.2.3	Imunossensores	20
1.3	Ressonância de Plásmons de Superfície (SPR).....	21
1.4	Monocamadas auto-organizadas (SAMs do inglês Self-Assembled Monolayers)	23
1.4.1	Estrutura das SAMs.....	25
1.4.2	SAMs com diferentes adsorbatos	26
1.4.3	Preparação das SAMs sobre superfícies de ouro.....	28
a)	Limpeza do substrato de ouro	28
b)	Escolha do solvente	29
c)	Concentração do adsorbato e tempo de imersão	30
1.5	Desenvolvimento de novas plataformas para construção de imunossensores empregando monocamadas auto-organizadas (SAMs).....	30
2	OBJETIVOS	33
2.1	Geral.....	33
2.2	Objetivos específicos	33
3	METODOLOGIA	34
3.1	Reagentes e soluções	34
3.2	Equipamentos.....	34
3.3	Limpeza do eletrodo de ouro	36
3.4	Construção e caracterização das monocamadas simples e mistas.....	37

3.5	Ativação dos grupos funcionais da SAM	38
3.6	Construção do imunossensor através da SPR	38
3.7	Adição de antígenos de proteína C8 sobre o disco de ouro e detecção da imunorreação entre antígenos de Leishmania e anticorpos anti-Leishmania via SPR....	38
3.8	Produção do antígeno recombinante de Leishmania infantum.....	39
a)	Seleção.....	39
b)	Produção da proteína recombinante	39
c)	Soro Canino	40
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1	Caracterização das monocamadas auto-organizadas simples e mistas de ácido 11-mercaptoundecanoico e ácido 3-mercaptopropiônico por Voltametria Cíclica (VC) e Microscopia Eletroquímica de Varredura (SECM)	41
4.2	Caracterização das monocamadas auto-organizadas simples e mistas de ácido 11-mercaptoundecanoico e ácido 3-mercaptopropiônico por Dessorção Redutiva (RD)	46
4.3	Caracterização das monocamadas auto-organizadas simples e mistas de ácido 11-mercaptoundecanoico e ácido 3-mercaptopropiônico por Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE)	49
4.4	Construção do Imunossensor e Avaliação de sua capacidade de discriminação de soros positivos e negativos de L. Infantum por SPR	52
5	CONCLUSÕES	57
	REFERÊNCIAS	58

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são um grupo de doenças causadas por protozoários parasitas de mais de 20 espécies de *Leishmania* que podem ser transmitidas ao homem pela picada da fêmea do inseto flebotomíneos infectada (chamado de "mosquito palha" ou birigui, no continente americano). Trata-se de uma doença de abrangência mundial que ocorre principalmente em regiões tropicais e subtropicais (ROYCHOUDHURY *et al.*, 2015).

Existem três formas principais da doença: (i) leishmaniose cutânea (LC), (ii) leishmaniose mucocutânea (LMC) e (iii) leishmaniose visceral (LV). A manifestação da leishmaniose cutânea é a forma mais comum da doença e a leishmaniose visceral é a mais grave e cuja letalidade pode alcançar cerca de 10 % quando não se institui o tratamento adequado (WHO 2010). A leishmaniose ocorre, principalmente, no subcontinente indiano, na África Oriental e no Brasil. Embora cerca de 400.000 pessoas sejam afetadas anualmente por LV, com até 40.000 mortes por ano, a doença ainda é classificada entre as doenças tropicais negligenciadas (ABBASI *et al.*, 2016). Associado a isto, porém, não menos importante, o diagnóstico clínico instituído para a LV é complexo e na maioria das vezes comum a outras doenças como Doença de Chagas, Malária, Esquistossomose, Febre Tifoide e Tuberculose (ANDRADE *et al.*, 2009).

Dentre as diferentes técnicas sorológicas mais empregadas para o diagnóstico da LV estão os métodos baseados na reação em cadeia de polimerase (PCR), o ensaio imunoenzimático (ELISA), o teste de aglutinação direta (DAT) e o teste rápido de aglutinação (FAST). Contudo, estas técnicas sorológicas consomem muito tempo, porque são realizadas em vários passos, não são facilmente adaptáveis a grandes exames sorológicos de cães em áreas endêmicas (SRIVASTAVA *et al.*, 2011), bem como são frequentemente baseados em preparações de antígenos bruto que permitem a reação cruzada com outros tripanossomatídeos e apresentam baixa sensibilidade para detectar casos assintomáticos (BARBOSA-DE-DEUS *et al.*, 2002). Portanto, faz-se necessário o desenvolvimento de novos métodos e técnicas visando a construção e aplicação de plataformas simples para a detecção de *Leishmania infantum* (MUNGE *et al.*, 2011). Desta forma, os imunossensores aparecem como uma interessante alternativa ao diagnóstico sorológico da LV, uma vez que a imobilização de antígenos e anticorpos sobre a superfície de transdutores permite o desenvolvimento de sistemas rápidos, seletivos, sensíveis, e de baixo custo. Tais características estão associadas ao fato de os imunossensores exigirem pequenos volumes de amostras de forma a permitir, não apenas o

diagnóstico da doença em um determinado indivíduo, mas também promover o acompanhamento da evolução da doença em áreas endêmicas (SOUTO *et al.*, 2013).

Neste contexto, a ressonância de plásmons de superfície (SPR) se apresenta como uma interessante alternativa para o desenvolvimento de imunossensores para a detecção de doenças parasitárias importantes como a LV tendo em vista que trata-se de um sistema de transdução altamente sensível, miniaturizável, reprodutivo e de baixo custo.

1.1 Leishmaniose

A Leishmaniose é um grupo de doenças que envolve espécies do gênero *Leishmania* pertencentes à família Trypanosomatidae, as quais são transmitidas aos humanos por picadas das fêmeas dos insetos Flebotomíneos infectados. A epidemiologia da leishmaniose depende das características das espécies do parasita, das características ecológicas do local, da exposição atual ou passada do homem ao parasita e do comportamento humano. Cerca de 70 espécies de animais, incluindo humanos, têm sido usados como reservatórios para o parasito da *Leishmania*. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a leishmaniose é uma doença endêmica que atinge mais de 80 países no mundo e ameaça mais de 350 milhões de pessoas, apresentando três principais manifestações (WHO, 2016).

A Leishmaniose Visceral (LV), também conhecida como calazar, é fatal se não for tratada em mais de 95% dos casos. Ela é caracterizada por ataques irregulares de febre, perda de peso, aumento do baço e do fígado e anemia. É uma doença endêmica no subcontinente indiano e no leste da África. Estima-se que 200.000 a 4000.000 novos casos de LV ocorrem em torno do mundo por ano. Em 2014, mais de 90% de novos casos reportados pela OMS ocorreram em 6 países: Brasil, Etiópia, Índia, Somália, Sudão do Sul e Sudão (WHO, 2016).

A Leishmaniose Cutânea (LC) é a forma mais comum da leishmaniose e causa lesão na pele, principalmente ulcerações, em partes expostas do corpo, deixando cicatrizes permanentes e deficiências graves. Em torno de 95% dos casos ocorrem nas Américas, Bacia Mediterrânea, Oriente Médio e Ásia Central. Mais de dois terços dos novos casos de LC ocorrem em 6 países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Irã (República Islâmica) e República Árabe da Síria. Uma estimativa de 0,7 a 1,3 milhões de novos casos ocorrem ao redor do mundo, anualmente (WHO, 2017).

A Leishmaniose Mucocutânea (LMC) leva a destruição total ou parcial das membranas mucosas do nariz, boca e garganta. Quase 90% dos casos da LMC ocorrem na Bolívia (Estado Plurinacional), Brasil e Peru (WHO, 2017).

Como a LV é a manifestação da doença causadora da maior quantidade de óbitos dentre as Leishmanioses, ela merece uma maior atenção. O Brasil está entre os cinco países onde residem 90% dos casos de LV do mundo, atingindo principalmente a população menos favorecida. Entre 1996 e 2006 foram notificados 50 mil casos de LV, o que faz do país o de maior ocorrência da doença no nosso continente sendo as crianças menores de 10 anos um dos grupos de maior incidência da doença (BERGNER *et al.*, 2013; NAGY *et al.*, 2000). De acordo com a OMS, essa é uma das sete endemias mundiais e sua importância se dá pela elevada incidência e ampla distribuição da doença, além das implicações econômicas, transformando-se em um sério problema sanitário e econômico-social.

Nas Américas a LV é causada pela *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* (*L. (L.) i. chagasi*) e transmitida pelos dípteros *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi* (MENDES *et al.*, 2014). O cão é o principal reservatório doméstico de *L. (L.) i. chagasi* e responsável pela manutenção desse agente em áreas endêmicas (WHO 2010). O agente etiológico da LV foi descrito pela primeira vez em 1937 e recebeu o nome específico de *Leishmania chagasi*. Trata-se de um parasita protozoário pertencente à família *Trypanosomatidae* e ao gênero *Leishmania*. A decisão de considerá-lo uma nova espécie de *Leishmania* deveu-se principalmente aos repetidos resultados negativos que se seguiram às tentativas de infecção experimental de cachorros com o parasita, o que o distinguiu do outro agente etiológico de LV já conhecida em alguns países europeus da Bacia do Mediterrâneo como *Leishmania infantum* (SILVEIRA e CORBETT, 2010). Entretanto, apenas cinquenta anos após a descrição da *Leishmania chagasi*, foi reclassificada através de uma profunda revisão, para o gênero *Leishmania* e o parasita como membro do subgênero *Leishmania*, espécie *Leishmania (Leishmania) chagasi* (LAINSON e SHAW, 1987).

No Maranhão até o ano de 1984 os dados acumulados demonstram que do total de casos registrados no estado, cerca de 71.896 foram procedentes da ilha de São Luís. Deste total, o município de São Luís foi responsável por 58,5%, São José de Ribamar por 11,5% e 1,8% diagnosticados na localidade de Paço do Lumiar (COSTA *et al.*, 1995). Em 2014 foram notificados 557 novos casos e destes houve 293 na faixa etária de 20 a 49 anos. De janeiro a julho deste mesmo ano foram notificados 224 casos novos, sendo 114 em pessoas de 20 a 49 anos. Em São Luís, foram confirmados em 2014, 11 casos da Leishmaniose Tegumentar

Americana (LTA) e em 2015 quatro casos. Já em relação a LV, foram confirmados 51 casos em 2014 e 32 em 2015 (SES, 2017).

Um dos grandes entraves no acompanhamento da proliferação da doença é o diagnóstico. Embora muitos avanços tenham ocorrido na área, ainda não se conhece teste com 100% de sensibilidade e especificidade ao parasita. Por exemplo, em testes parasitológicos, os quais chegam a apresentar 98% de sensibilidade ao parasita é necessário extrair amostras do baço tornando tais métodos, no mínimo, inadequados para estudos epidemiológicos (EDWARDS *et al.*, 2006).

Atualmente, os testes diagnósticos imunológicos baseados em aglutinação direta (DAT), reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e ensaio imunoenzimático (ELISA) estão dentre os mais comuns. Os testes de RIFI e ELISA são os mais empregados no País tanto para diagnóstico de Leishmaniose humana, quanto para a canina (MS, 2014; SRIVASTAVA *et al.*, 2011). A baixa especificidade associada à necessidade de operadores altamente treinados no emprego da RIFI torna a técnica dispendiosa além de apresentar como limitação a ocorrência de ligações cruzadas com Leishmaniose tegumentar, doença de Chagas, malária, esquistossomose e tuberculose pulmonar. Por sua vez, o teste de ELISA é de fácil leitura e execução, porém menos sensível e específico que o RIFI (ABBASI *et al.*, 2016).

Portanto, o desenvolvimento de testes diagnósticos precisos para a LV é altamente desejável para controlar a transmissão e a disseminação da doença. Neste sentido, os biossensores baseados em afinidade (ou imunossensores) surgem como uma alternativa que permite uma análise rápida e sensível ao diagnóstico de *L. Infantum*.

1.2 Biossensores

Formalmente, a IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) propõe a seguinte definição para biossensor: “*Um biossensor é um instrumento integrado que é capaz de fornecer uma informação analítica específica, quantitativa ou semi-quantitativa através do uso de um elemento de reconhecimento biológico (receptor bioquímico) que está em contato direto com o elemento de transdução*” (THÉVENOT *et al.*, 2001). Os biossensores também podem ser definidos como dispositivos que utilizam um elemento de reconhecimento biológico como enzimas, anticorpos, antígenos, tecidos, células ou ácidos nucléicos diretamente ligados a um elemento de transdução, o qual pode ser do tipo eletroquímico, óptico, piezoelétricos, entre outros.

A biomolécula faz o reconhecimento do analito mediante uma reação bioquímica gerando um sinal que pode ser resultante de uma variação na concentração de prótons, variação de massa, liberação de gases, emissão ou absorção de luz, mudança de estado de oxidação, entre outros. O elemento de transdução é o responsável por transformar esse sinal bioquímico em um sinal quantificável que é processado em um elemento processador de sinal de forma a possibilitar a quantificação do elemento biológico.

Para que o biosensor seja apropriado para utilização na análise bioquímica é desejável que ele possua certas propriedades como boa estabilidade, tempo de resposta eficiente, baixo limite de detecção, alta seletividade e exatidão. Para tanto, é necessário monitorar algumas propriedades, como o pH, concentração, natureza da solução tampão, temperatura, tipo de imobilização das biomoléculas e efeitos de ativadores, inibidores e interferentes. Os biosensores podem ser classificados em duas categoriais no que tange a natureza do processo de reconhecimento biológico: biosensores biocatalíticos e biosensores de afinidade.

1.2.1 Biosensores biocatalíticos

Incluem-se nesta classe os biosensores que têm como componente biológico as enzimas, células inteiras ou fragmentos de tecidos. Como relatado por Souto (2012), os biosensores eletroquímicos usam principalmente enzimas por possuírem alta atividade biocatalítica e seletividade, devido à forte ligação da molécula de substrato pelo seu sitio ativo.

Para Silva (2011), as maiores desvantagens do uso de enzimas na construção de biosensores são: (i) o fato de apresentarem uma estabilidade relativamente baixa, principalmente no que diz respeito à variação das condições físico-químicas do meio reacional, (ii) o elevado custo econômico e (iii) o fato de algumas reações enzimáticas requererem cofatores que, se não foram facilmente regenerados, encarecem ainda mais o uso dos biosensores enzimáticos.

1.2.2 Biosensores de afinidade

São dispositivos nos quais os biorreceptores se ligam às moléculas do analito levando à formação ou dissociação de um complexo que promove mudanças físico-químicas que podem ser detectadas pelo transdutor. Esses biorreceptores podem ser anticorpos, receptores de membrana ou oligonucleotídeos. Um biosensor enzimático converte um substrato em produto

e o transdutor irá quantificar o sinal ou do substrato ou do produto. Por outro lado, o elemento biológico liga-se especificamente ao analito nos biossensores de afinidade formando um complexo que o transdutor poderá quantificar.

1.2.3 Imunossensores

O imunossensor é um tipo de biosensor baseado na reação imunológica de forma que o antígeno ou anticorpo possa ser imobilizado na superfície do transdutor (RICCARDI *et al.*, 2002). Os imunossensores são ferramentas altamente sensíveis e seletivas, porém geralmente não é possível reverter o complexo antígeno-anticorpo formado. Neste sentido, a alta seletividade envolvida no reconhecimento molecular entre antígenos e anticorpos é o principal fundamento para o desenvolvimento de dispositivos analíticos baseados em imunoenaios. (OLIVEIRA, 2013)

Os imunossensores podem ser desenvolvidos com facilidade devido à grande variedade de anticorpos existentes atualmente no mercado, a alta sensibilidade na detecção do analito e o baixo custo de produção. Logo, os mesmos têm sido muito utilizados para a criação de novos meios de diagnósticos precisos para patologias. Conseqüentemente, tem havido uma grande busca ao desenvolvimento de imunossensores explorando as mais variadas formas de transduções incluindo a: microbalança de cristal de quartzo (QCM) (JESUS *et al.* 2011), espectroscopia de impedância eletroquímica (HOU *et al.*, 2016; MAYORGA-MARTINEZ *et al.*, 2015) e a SPR (SOUTO *et al.*, 2013, SOUTO *et al.*, 2015a, SOUTO *et al.*, 2015b). Embora essas técnicas sejam ferramentas poderosas para o estudo de interações biomoleculares, algumas delas têm sido limitadas pelo menos por seu alto custo instrumental incluindo a necessidade de cristais de quartzo piezoelétrico de alta frequência fundamental coberto por filmes finos de metal nobre ou requer complexa análise de resposta de frequência baseada em circuito equivalente e em analisadores de frequência (GRIESHABER *et al.*, 2008).

Neste sentido, a técnica de SPR vem demonstrando grande potencial para a análise de processos imunológicos devido a sua extrema sensibilidade para pequenas mudanças no índice de refração próxima a superfície do biosensor e a capacidade de detecção em tempo real e *in vivo*, sem a necessidade de marcadores.

1.3 Ressonância de Plásmons de Superfície (SPR)

Segundo Homola (2008) a primeira observação de plásmons de superfície foi feita em 1902 pelo físico Wood, que relatou anomalias no espectro de luz difratada em uma rede de difracção metálica. Otto (1968) demonstrou que a queda na reflectividade no método de reflexão total atenuada (ATR) é devido à excitação de plásmons de superfície. E posteriormente Kretschmann e Raether observaram a excitação de plásmons de superfície em outra configuração do método de reflexão total atenuado. Essas obras pioneiras de Otto, Kretschmann e Raether(1968) estabeleceram um método conveniente para a excitação de plasmões de superfície.

A análise de interações bioespecíficas em tempo real através da técnica de SPR, tem recebido crescente interesse devido ao conjunto de informações que ela pode fornecer acerca do processo de interação biomolecular, como modelos de interação de afinidade intermolecular, análise cinéticas e validação analítica. (DAMOS *et al.*, 2004)

A técnica de SPR baseia-se em propriedades ópticas e pode ser empregada para estudos de fenômenos de superfície mediante o monitoramento da mudança do índice de refração devido, por exemplo, a ligação de uma camada orgânica à superfície do metal. A SPR é uma oscilação da densidade de carga longitudinal ao longo da interface de dois meios com constantes dielétricas de sinais opostos, onde um é metal e o outro é um dielétrico. A escolha do metal a ser usado é essencial pois o metal deve exibir comportamento de elétrons livres. Os metais mais adequados são prata, ouro, cobre e alumínio, dentre os quais a prata e o ouro são os mais empregados. (CARVALHO *et al.*, 2003).

A grande parte dos sistemas de SPR explora a configuração de Kretschmann pois nessa configuração o filme metálico é colocado diretamente sobre o prisma e os plásmons de superfície são excitados quando o feixe de luz atravessa o prisma e atinge o filme metálico. Neste caso, são explorados sistemas capazes de proporcionar o fenômeno físico da reflexão interna total.

Na reflexão interna total, a luz passa entre os meios com índice de refração diferentes e parte da luz é refratada e a outra parte é refletida na interface. Quando o ângulo de incidência aumenta o ângulo de refração também aumenta. Se o ângulo de refração é 90° , o raio refratado é paralelo a interface. O ângulo de incidência em que isso acontece é chamado ângulo crítico. Quando o ângulo de incidência é maior que o ângulo crítico a componente do raio refratado é mínima e todo o feixe de luz é refletido.

Para ângulos de incidência superiores ao ângulo crítico a energia da radiação é absorvida por elétrons livres da placa metálica de forma a originar um campo eletromagnético evanescente que são propagadas perpendicularmente à interface metal/dielétrico. Quando parte da radiação excita os elétrons livres na placa metálica e ocorre o fenômeno de SPR. Em decorrência da geração da onda plasmônica, o feixe de luz incidente transfere energia para a placa metálica reduzindo a intensidade da luz refletida. Quando o acoplamento entre a onda de plásmons de superfície e a radiação incidente é máxima, o ângulo de incidência passa a ser chamado de ângulo de SPR crítico. Quando o índice de refração da superfície acima da placa metálica é alterado pela adsorção de uma camada proteica, por exemplo, o ângulo de incidência muda para que o plásmon de superfície seja excitado.

Contudo, para que as ondas plasmônicas de superfície (OPS) entre em ressonância com a radiação incidente é necessário que ambas tenham vetores de onda de igual magnitude. Uma vez que o vetor de propagação da OPS é superior ao da onda incidente, a excitação da OPS não ocorre mediante o contato direto destas ondas eletromagnéticas. Portanto, foram desenvolvidos sistemas ópticos para elevar o momento da onda incidente de forma que a OPS possa receber energia da onda incidente através de uma transferência ressonante de energia. (DAMOS *et al.*, 2004)

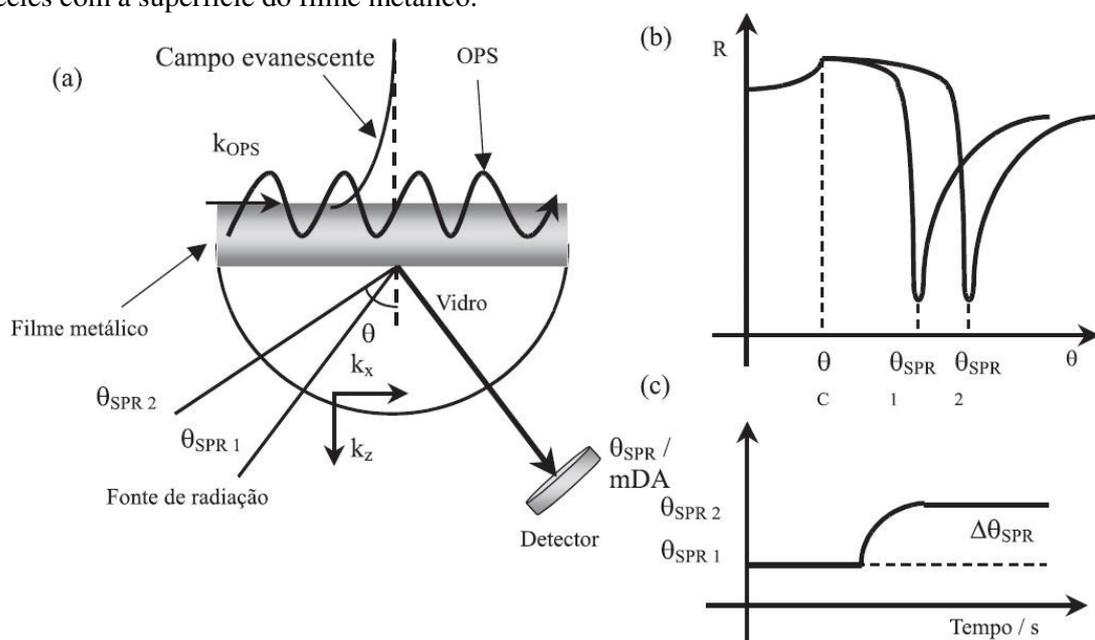
Durante a reflexão interna total ocorre a propagação de uma fração da onda incidente na interface de forma a penetrar no meio de menor densidade óptica dando origem a um campo eletromagnético evanescente (Figura 1 a). Ao se estender até o ambiente esta fração da radiação incidente acopla-se aos elétrons livres oscilantes do metal de forma que alterações nas proximidades da interface metal/ambiente promovam uma alteração nas condições de ressonância do sistema. Como resultado, ocorre um deslocamento no ângulo (θ) SPR. Assim, é possível utilizar o ângulo da luz incidente como um parâmetro de controle do fenômeno de OPS mediante um monitoramento da refletância vs ângulo de incidência de luz (Figura 1 b). Portanto, mediante o monitoramento do índice de refração nas proximidades da superfície do disco sensor, é possível aplicar a SPR para se obter informações sobre velocidade e extensão da adsorção, determinação de propriedades dielétricas, cinética de associação e dissociação, bem como constantes de afinidades em interações específicas (Figura 1 c). (DAMOS *et al.*, 2004)

A instrumentação da espectroscopia de SPR pode ser alterada de diversas formas para medir a variação do ângulo de ressonância. Os componentes essenciais de um SPR

fundamentado na configuração de Krestchmann são uma fonte luminosa plano-polarizada, um prisma recoberto com um filme metálico em sua superfície e um fotodetector.

Como descrito por Souto (2012), para uma melhor resolução dos sistemas de transdução, a superfície de ouro pode ser modificada através das Monocamadas Auto-Organizadas.

Figura 1 - (a) Representação esquemática da configuração de Kretschmann para SPR. O dielétrico em contato com o metal possibilita a transferência ressonante de energia incidente para a OPS; (b) Curvas de refletância na ausência (θ_{SPR1}) e presença (θ_{SPR2}) de espécies na superfície do filme metálico; (c) Sensorgrama esquemático representativo entre o ângulo SPR (θ_{SPR}) e tempo durante a interação de espécies com a superfície do filme metálico.



Fonte: DAMOS *et al*, 2004

1.4 Monocamadas auto-organizadas (SAMs do inglês Self-Assembled Monolayers)

O controle e manipulação das propriedades das superfícies empregadas como plataformas para o desenvolvimento de biossensores podem proporcionar uma variedade de características atrativas e reduzir efetivamente muitos dos problemas comumente apresentados por inúmeros tipos de biossensores (MEHROTRA, 2016). Neste sentido, vários métodos têm sido empregados para modificação da superfície de plataformas empregadas no desenvolvimento de biossensores incluindo a adsorção irreversível de certas substâncias que possuam os grupos funcionais desejados, a cobertura das plataformas com filmes poliméricos, uso de materiais compósitos, entre outras estratégias (SHAIDAROVA *et al*, 2008).

Os filmes finos nanoestruturados têm sido vastamente explorados em diferentes áreas, as quais englobam compostos orgânicos, poliméricos e biológicos, além dos metálicos e inorgânicos (RODUNER, 2006). A montagem destes filmes ultrafinos é essencial para o desenvolvimento de dispositivos moleculares e sensores devido à possibilidade de combinação de diversos materiais (MOSSANHA, 2011).

A formação das SAMs de tióis sobre superfície metálica constitui um método bastante interessante de obtenção de uma superfície com alto grau de ordenação controlada quimicamente (GALLI, 2009). Este tipo de modificação emprega camadas monomoleculares que exibem uma alta organização e que são formadas espontaneamente como consequência da imersão de uma superfície sólida em solução constituída de moléculas anfóteras. A adsorção deste tipo de molécula é resultado de uma alta afinidade do grupo funcional do adsorvente pelo substrato, que apresenta uma especificidade para interagir com a superfície do substrato e a organização das moléculas na superfície se dá através das interações atrativas da cadeia lateral (Van der Waals, ligações de hidrogênio) (FREIRE *et al.*, 2003).

A princípio, a primeira forma de auto-organização de moléculas orgânicas em substratos sólidos foi constatada pela formação de camadas de derivados de silanos sobre superfícies hidroxiladas de silício. Essa técnica de produção de monocamadas era impulsionada pela formação de polissilanos via ligação Si—O—Si. Outra forma de produção de filmes finos foi descoberta por Blodgett, ao desenvolver uma técnica atualmente conhecida como Langmuir-Blodgett (LB), onde os filmes são produzidos através da transferência de um filme de Langmuir, composto por moléculas anfifílicas na interface água/ar, para um substrato sólido (COELHO, 2011).

Nuzzo e Allara, em 1983, relataram pela primeira vez o uso de moléculas organosulfuradas para formação de SAM sobre o ouro (FISCHER, 2011). As estruturas apresentaram formação espontânea na forma de uma monocamada auto-organizada, resultando em uma estrutura ordenada e orientada. Mais tarde constatou-se que a adsorção dessas moléculas ocorria através da quimissorção dos tióis na superfície de ouro, formando uma ligação com caráter covalente, o que aumentava a estabilidade das monocamadas formadas, quando comparadas as demais técnicas de produção de filmes (COELHO, 2011).

Essas características têm levado a um uso extensivo de plataformas modificadas, incluindo: (i) estudos da interação de proteínas com superfícies metálicas, (ii) estudos de transferência eletródica direto entre proteínas redox e eletrodos, bem como (iii) na fabricação de biossensores enzimáticos (VERICAT *et al.*, 2010). Além disto, a dimensão da monocamada,

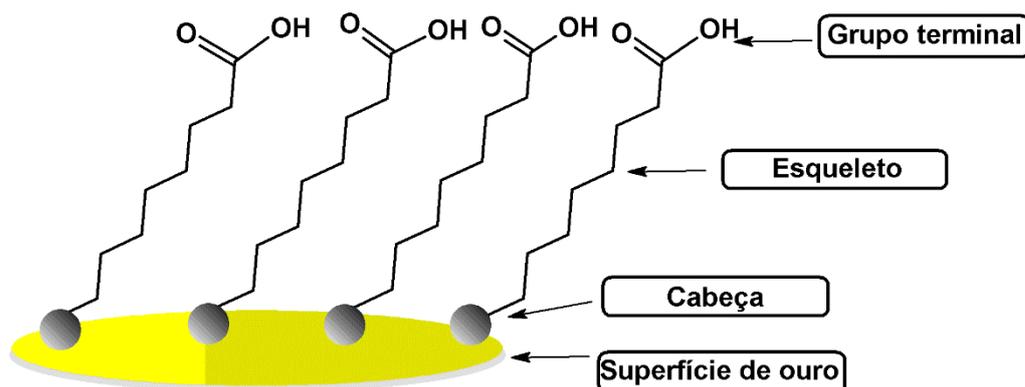
que se situa em escala molecular, evita uma difusão lenta das espécies eletroativas para a superfície, principalmente quando comparada com a cinética apresentada pelos eletrodos modificados com filmes poliméricos finos ou por compósitos. As SAMs, ainda, reduzem as correntes capacitivas e, também, a acumulação de espécies indesejadas sobre a superfície do eletrodo, evitando assim a passivação da superfície do eletrodo (GALLI, 2009).

1.4.1 Estrutura das SAMs

Uma forma adequada para se descrever as moléculas que constituem as SAMs, é dividir a mesma em três partes, como mostrado na Figura 2: cabeça (grupo ligante), esqueleto (cadeia principal) e grupo terminal (interage com o ambiente). A cabeça (grupo do S) inicia o processo de organização criando uma ligação covalente forte entre a molécula e o substrato. Interações intermoleculares entre as cadeias carbônicas (esqueleto) finalizam o empacotamento de alta regularidade da monocamada.

O grupo terminal dita as propriedades da superfície. Escolhendo de forma minuciosa o grupo terminal é possível se obter uma monocamada hidrofílica ou hidrofóbica, com repulsão a metais ou atração e até escolher um grupo exposto capaz de reagir com moléculas em uma solução (FISCHER, 2011).

Figura 2 - Esquema da formação de uma SAM sobre uma superfície de ouro.



Fonte: Próprio autor

As moléculas em monocamada se organizam na vertical com uma inclinação dos esqueletos das moléculas (cadeias carbônicas) em relação a superfície do substrato. Esta inclinação é resultado das interações de Van der Waals (que buscam a minimização da energia) entre as cadeias que estão unidas pelo grupo tiolato (FISCHER, 2011).

1.4.2 SAMs com diferentes adsorbatos

O grupo terminal de monocamadas não influencia somente a organização das moléculas na superfície do substrato uma vez que as terminações das SAMs são responsáveis pela interface com o meio reacional e, conseqüentemente a escolha da funcionalidade do grupo terminal é crucial para o desempenho requerido (UMEDA e FUKUI, 2010). Logo, as mudanças do grupo terminal implicam na alteração das propriedades físicas e químicas da SAM e isso tem sido intensamente explorado para produção de superfícies diferenciadas. Vislumbrando a possibilidade de se obter uma superfície com múltiplas funcionalidades, alguns pesquisadores estudaram o comportamento de monocamadas obtidas a partir de uma mistura de alcanotióis com diferentes grupos terminais (COELHO, 2011).

Entretanto, o mecanismo de formação das SAMs por co-adsorção de diferentes tióis ainda não é inteiramente compreendido. Alguns estudos mostram a formação de fases segregadas enquanto outros mostram a formação de uma mistura homogênea (COELHO, 2011).

Phong e colaboradores (2007) reportaram a formação de SAM constituídas por 3 componentes, exibindo domínios distintos constituídos por zonas de composição mista contendo AET-MES (AET = 2-aminoetanotiol; MES = ácido 2-mercaptoetano-sulfônico, hidrofílicos e cujas interações eletrostáticas parecem favorecer a sua formação) e outras compostas de 1-dodecanotiol (hidrofóbico), e que a formação, composição e predominância de cada um dos domínios depende da concentração inicial de cada tiol na solução de formação e do tempo de imersão.

Bain et al. (1989) avaliaram a formação de monocamadas a partir de uma solução etanólica contendo $\text{HS}(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ e $\text{HS}(\text{CH}_2)_n\text{OH}$. Analisando o ângulo de contato formado com água e hexadecano sobre a SAM mista, os autores concluíram que não se observa a formação de fases segregadas, mas sim uma mistura homogênea. Neste caso, o comprimento da cadeia carbônica influencia diretamente a formação da mistura homogênea. Isso ocorre por que a interação de Van der Waals entre as cadeias carbônicas são as mesmas para ambos os tióis. No entanto alterando o solvente empregado, pode se favorecer a adsorção de um dos tióis em relação ao outro. Em solventes polares observa-se que a adsorção do componente apolar é favorecida devido às interações entre os grupos metílenos serem favorecidas pela baixa solvatação do tiol. A situação inversa também é observada, onde, em solventes apolares a adsorção do componente mais polar é favorecida.

Existem três maneiras para realizar a co-adsorção de tióis para a formação das SAMs mistas: imersão em solução contendo ambos os tióis precursores; substituição eletroquímica seletiva de tióis adsorvidos e controle estrutural da superfície do substrato.

A co-adsorção de tióis em solução frequentemente produz monocamadas com componentes misturados homoganeamente. A obtenção de uma SAM mista com fases bem organizadas e separadas com a simples imersão do substrato em solução dos tióis precursores, exige atenção a alguns fatores importantes. Deve-se escolher tióis com estruturas químicas que garantam interações laterais mais estáveis com moléculas com a mesma estrutura (SMITH *et al.*, 2001). Dessa forma, a formação de ilhas contendo majoritariamente um dos componentes da mistura será favorecida e a SAM mista apresentará domínios distintos. Em resumo, ilhas com diferentes domínios e diâmetros podem ser obtidas a partir do controle da fração molar e estrutura química dos tióis precursores, tempo de adsorção e condições superficiais do substrato (O'DWYER *et al.*, 2004; SMITH *et al.*, 2001).

Quando se deseja a formação de uma SAM mista com fases distintas, mas os componentes da mistura são estruturalmente semelhantes, a co-adsorção simultânea não pode ser empregada, visto que a probabilidade de se formar uma mistura homogênea é grande (KAKIUCHI *et al.*, 2001).

A substituição eletroquímica seletiva é realizada em duas etapas. A primeira etapa consiste na formação de uma SAM mista por co-adsorção de tióis com estruturas químicas diferentes para criar a plataforma artificial com fases separadas (PHONG *et al.*, 2008). Para isso, emprega-se uma mistura contendo um dos componentes desejados e um tiol que possa ser desorvido seletivamente da superfície aplicando um determinado potencial. A desorção do tiol cria vacâncias na monocamada que podem ser ocupadas pelo segundo (HOBARA *et al.*, 1999). Na segunda etapa a SAM mista é obtida pela imersão do substrato contendo somente o primeiro componente (e regiões de vacâncias) em uma solução do segundo componente da mistura. Com isso, têm-se uma SAM mista com fases segregadas mesmo que os tióis sejam estruturalmente semelhantes. A vantagem desse método é a formação de domínios pré-estabelecidos dos tióis, os quais podem ser controlados pela fração molar das espécies em solução responsáveis pela formação da plataforma artificial (COELHO, 2011).

A distribuição dos domínios de diferentes tióis nas SAMs pode ser obtida também pelo controle estrutural da superfície do substrato. Utilizando a Deposição sob Regime de Subtensão (DRS) de um metal sobre o substrato, sítios heterogêneos são gerados a nível molecular. Imergindo o substrato em solução contendo um dos tióis forma-se uma SAM sobre toda a

superfície. No entanto os sítios gerados com a DRS podem ser dissolvidos aplicando um potencial para oxidação do metal. Assim formam-se ilhas com a superfície do substrato exposta. Para a obtenção da SAM mista basta que o substrato seja imerso em uma solução contendo o segundo tiol, o qual adsorverá sobre os sítios expostos, formando assim domínios distintos (SHIMAZU *et al.*, 2002).

1.4.3 Preparação das SAMs sobre superfícies de ouro

A preparação da monocamada possui um papel fundamental no desempenho eletroanalítico do eletrodo modificado. A estrutura da monocamada depende fortemente do substrato e de sua morfologia, da natureza do acoplamento e das forças intermoleculares entre as moléculas do adsorbato. Considerando-se que a espessura final da monocamada é de dimensão molecular e que, em muitos casos, o substrato não é atômica e plano sobre toda a superfície do eletrodo, a existência de defeitos na monocamada (que são muitas vezes chamados de “pin-holes”) é inevitável. Tais defeitos podem ter um efeito pronunciado no comportamento eletroquímico do eletrodo, que se pode assemelhar a um arranjo de ultramicroeletrodos. Assim, o pré-tratamento das superfícies dos eletrodos é muitas vezes um pré-requisito importante antes da montagem da monocamada. Uma grande variedade de procedimentos tem sido reportada, incluindo tratamentos térmicos e químicos, ou ainda pré-tratamentos eletroquímicos, todos objetivando produzir superfícies limpas, homogêneas, relativamente planas e reprodutivas. (FREIRE *et al.*, 2003)

O protocolo mais comum para a preparação da SAM em ouro, prata, paládio, mercúrio e outros materiais é a imersão de um substrato previamente limpo em uma solução etanólica de tióis diluída.

a) Limpeza do substrato de ouro

O substrato mais utilizado para a construção das SAMs é o ouro. A quimissorção de tiolatos sobre o ouro ocorre espontaneamente. Dentre as razões de o ouro ser o metal preferido e a classe mais utilizada para a formação das SAMs a partir do ponto de vista eletroquímico pode-se citar: sua relativa inércia; a formação de monocamadas bem empacotadas; forte interação específica e estabilidade com o enxofre, permitindo a formação de monocamadas na presença de muitos outros grupos funcionais; além de ser um metal fácil de ser obtido na forma

de colóide ou filme fino e apto a estudos biológicos já que muitas células podem aderir em sua superfície (MOCCELINI *et al.*, 2010)

As técnicas de pré-tratamento mais utilizadas para a purificação da superfície de ouro são os polimentos mecânicos com alumina; a oxidação química por meio da radiação UV, plasma de O₂ ou por solução fortemente oxidante como H₂SO₄/H₂O₂ (conhecida como solução “piranha”); limpeza eletroquímica realizada em solução 0,5 molL⁻¹ de H₂SO₄ pela ciclagem no potencial do eletrodo de ouro entre -0,15V e 1,8V (vs. Eletrodo de calomelano saturado – ECS), redução química com etanol, muito utilizado após tratamento eletroquímico para certificar a limpeza da superfície e/ou a combinação de duas ou mais técnicas.(CANCINO *et al.*, 2013)

A formação da monocamada deve ocorrer imediatamente após o pré-tratamento, pois a exposição pode acarretar em uma nova adsorção de impurezas.

b) Escolha do solvente

O solvente pode interferir na cinética de formação e mecanismo de organização das SAMs. O parâmetro que governa a adsorção do tiol está relacionado a interação solvente-substrato e solvente-adsorbato. Se as moléculas tioladas possuem mais afinidade pelo solvente que pela superfície metálica, a taxa de formação da SAM será altamente afetada. Por outro lado, se o solvente possuir grande afinidade pelo substrato pode ocorrer um impedimento da troca das moléculas do solvente pelas do adsorbato, dificultando a adsorção do tiol (Carvalho, 2005).

Por apresentar características como baixo custo comercial, alta pureza, pouca toxicidade e por dissolver uma variedade de tióis das mais diferentes polaridades e tamanhos de cadeias carbônicas, o etanol é o solvente utilizado com mais frequência no desenvolvimento das SAMs.

c) Concentração do adsorbato e tempo de imersão

Termodinamicamente a organização das SAMs são espontâneas, visto que a energia livre de gibbs ΔG é muito baixa, portanto, a energia adquirida entre as interações laterais da cadeia carbônica é suficiente para sobrepor essa barreira energética (GOODING *et al.*, 2003). Por isso, apesar da adsorção dos alcanotióis ser espontânea a organização demanda tempo (GARCIA-RAYA *et al.*, 2008).

A concentração e o tempo de imersão são inversamente proporcionais, ou seja, baixas concentrações de tióis em solução requerem tempos maiores de imersão (BENSEBAA *et al.*, 1997). Experimentalmente, as SAM formadas em soluções bem diluídas, menores que $1 \mu\text{mol L}^{-1}$, mesmo em tempos longos de imersão, como os de uma semana, não exibem as mesmas propriedades físicas que aquelas formadas em soluções mais concentradas (BAIN *et al.*, 1989). Isto ocorre pois a não saturação da superfície devido a um pequeno número de tióis adsorvidos faz com que essa superfície seja mais acessível à ligação de impurezas ou outros compostos contendo enxofre. (SOUTO, 2012)

Muitos estudos empregando espectroscopia e eletroquímica sugerem que as SAM formadas em soluções contendo $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ do respectivo tiol, não mudam significativamente com o aumento do tempo de imersão acima de 18 horas. Entretanto, como citado por Souto (2012) e Mendes (2006), tempos de imersão maiores melhoram a reprodutibilidade e confiabilidade das SAMs, principalmente em estudos de transferência de elétrons.

1.5 Desenvolvimento de novas plataformas para construção de imunossensores empregando monocamadas auto-organizadas (SAMs)

Devido às características apresentadas pelas SAMs, nas quais facilitam a imobilização de espécies sem a utilização de matrizes complexas. Com isso estas estão sendo cada vez mais utilizadas para a construção de biossensores, pois um dos grandes desafios para a construção de biossensores mais sensíveis, robustos e de maior confiabilidade é a imobilização das biomoléculas sobre superfícies condutoras, em sua forma estável e com a manutenção de suas propriedades biológicas de reconhecimento (GALLI, 2009).

Ramos-Jesus e colaboradores (2011) propuseram um imunossensor piezoelétrico para determinar anticorpos de *Leishmania Chagasi* em soro canino através de SAM. A SAM foi montada no eletrodo de cristal de quartzo pela interação tio-ouro, no qual o tiol utilizado foi o

aminoetanotiol cisteamina. Os grupos amina da cisteamina promovem sítios reacionais para ligações covalentes com o glutaraldeído e em seguida o antígeno rLci2B-NH6 é imobilizado através da base de Schiff, via glutaraldeído-histidina. Essa imobilização foi dada colocando sobre a superfície do eletrodo de quartzo uma solução de 50 mM de cisteamina por 2h, sendo posteriormente, incubado o glutaraldeído 2,5% (v/v) por 45 min. Então, o eletrodo modificado foi incubado com o antígeno rLci2B-NH6 (3mg/mL) por 1h. Na área ativa do cristal de quartzo foi aplicado 200 µL do soro canino na diluição de 1:400 em tampão PBS por 15 min e então analisado. O imunossensor apresentou boas respostas para o antígeno recombinante *L. Chagasi* com coeficiente de correlação de 0,981.

Souto e colaboradores (2013) desenvolveram um imunossensor plasmônico para detecção de anticorpos de anti-*Leishmania infantum* em soro canino e para isso utilizaram monocamadas auto organizadas de 11-MUA sobre um disco sensor de SPR. A SAM foi produzida imergindo o disco de ouro em uma solução alcoólica de 11-MUA por 24h. Para a montagem do imunossensor, o grupo terminal da SAM foi ativado previamente em uma solução aquosa de EDC-NHS (100 mmol L⁻¹ de EDC e 150 mmol L⁻¹ de NHS) por aproximadamente 15 min para posterior imobilização da proteína covalentemente. Depois de ativado, o antígeno bruto de *L. infantum* (50 µg mL⁻¹) foi adicionado à SAM ativada. Os testes analíticos do imunossensor frente a amostras de soro nas diluições de 1:50 até 1:6400 resultaram em coeficiente de correlação de 0,995, uma boa linearidade e boa seletividade.

Cabral-Miranda e colaboradores (2014) utilizaram a SAM para confeccionar um imunossensor piezoelétrico com anticorpos monoclonal anti-*L. Infantum* para detecção do antígeno parasita em tecido do baço infectado com *Leishmania Infantum*. A SAM foi preparada colocando sobre a superfície do eletrodo de ouro quartzo uma solução de 50 mM de cisteamina por 2h em seguida, o imunossensor foi preparado incubado o glutaraldeído 2,5% (v/v) por 45 min, e adicionaram o anticorpo monoclonal anti-*L. Infantum* com o bloqueador por aproximadamente 2h. Então, os extratos do baço infectado com *Leishmania Infantum* nas diluições de 1:1000, 1:2000 e 1:4000, foram injetadas no imunossensor e incubado por 15 min. O imunossensor apresentou uma boa linearidade e seletividade, mostrando que ele pode ser utilizado para diagnosticar leishmaniose devido a sua alta especificidade, detectando 1.8×10^4 amastigota/g de baço infectado.

Souto e colaboradores (2015b) propuseram um imunossensor com a interação entre uma proteína recombinante e um dendrímero para imunodiagnóstico de leishmaniose visceral através de análise de SPR. A SAM foi formada pela adsorção da cisteamina sobre a superfície

do disco de ouro, adicionando solução alcoólica 2 mmol L⁻¹ da mesma por 24h. Em seguida o grupo terminal da SAM foi ativado com uma solução aquosa de glutaraldeído 2,5% (v/v) por aproximadamente 15 min. Então, a solução metanólica de PAMAN(G4) 10% foi adicionado sobre o CYS-SAM/Au durante a noite. Antes da incubação com o antígeno recombinante C1 50 µg mL⁻¹, os grupos amins do dendrímero foram ativados com glutaraldeído 2,5 % por aproximadamente 30 min. Após a incubação da C1 o imunossensor estava pronto para a análise do anticorpo anti-C1, o qual apresentou uma ótima linearidade para diluições até 1:12800 com baixo limite de detecção (LD=7.37 nmol L⁻¹) e quantificação (LQ = 7.83 nmol L⁻¹).

Souto e colaboradores (2015a) mostraram a viabilidade das técnicas SPR e QCM para determinação de anticorpos de LV através de uma nova proteína recombinante quimérica (CP10) utilizando SAM. Foi adicionado 11-MUA na concentração de 1,0 mmolL⁻¹ por 24h, para a formação da SAM na superfície do ouro. Então o grupo carboxílico terminal da SAM foi ativado com a adição do EDC-NHS (100 mmolL⁻¹ de EDC e 150 mmolL⁻¹ de NHS) por aproximadamente 10 min. Após a ativação, foi adicionado 467 nmol L⁻¹ do recombinante CP10. Então, o imunossensor foi utilizado para a detecção do anticorpo anti-*L. infantum*, o qual apresentando baixos limites de detecção para ambas as técnicas SPR (LD = 4.23 nmolL⁻¹) e QCM (LD = 4.61 nmolL⁻¹). O imunossensor apresentado pelos autores mostrou-se viável para a determinação de anti-CP10 tanto para o SPR quanto por QCM.

Ramos-Jesus e colaboradores (2016) desenvolveram um imunossensor piezoelétrico usando nanopartícula de ouro (AuNP) e antígeno recombinante rLci2B para detecção de anticorpos de *Leishmania infantum* em soro canino. O imunossensor foi preparado inicialmente pela adição de uma solução de nafion 5% na superfície do eletrodo de cristal de quartzo e seco a temperatura ambiente por cerca de 2h. Posteriormente uma suspensão contendo cisteamina modificada com nanopartícula de ouro foi adicionada ao filme, deixando incubar por 1h. Antes da imobilização do antígeno na superfície do AuNP, o rLci2B foi pré-incubado com EDC-NHS por 1h. Feito isso, o eletrodo modificado com AuNP foi incubado com rLci2B (3µg mL⁻¹) por 1h. Após a incubação foi adicionado uma solução 1:1 contendo 50 mmolL⁻¹ de glicina e 2,5 % (m/v) de BSA por 45 min. Com isso, o imunossensor estava pronto para detecção da anti-*L. infantum*, o qual apresentou uma boa linearidade (r = 0,989) para determinação do soro nas diluições de até 1:6000, mostrado ser um promissor diagnóstico para leishmaniose visceral.

Como exposto, os imunossensores que utilizam SAMs têm despertado grande interesse para a imobilização de antígenos brutos e/ou recombinantes como uma alternativa para detecção de anti- *L. infantum* e a SPR tem se apresentado como sistema mais promissor.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Esta monografia visa a construção de filmes fundamentados em SAMs como suporte para o desenvolvimento de imunossensores para anticorpos de Leishmaniose visceral canina mediante imobilização de antígenos recombinantes de *Lashmania infantum*.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Confeccionar e avaliar eletroquimicamente SAMs simples e mista de tióis orgânicos 11-MUA e 3-MPA;
- ✓ Ativar os grupos terminais das SAMs utilizando EDC-NHS;
- ✓ Avaliar o efeito de diferentes SAMs na imobilização de antígenos recombinantes de *L. infantum*;
- ✓ Investigar o processo de interação antígeno-anticorpo e características analíticas empregando SPR frente a amostras reais de soro canino positivo e negativo para *L. infantum*.

3 METODOLOGIA

3.1 Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados foram de alta pureza analítica e foram empregados sem etapas de purificação adicionais. Os reagentes ácido 11-mercaptopundecanóico (11-MUA), ácido 3-mercaptopropiônico (3-MPA), EDC, NHS e ferricianeto de potássio foram obtidos junto a Sigma-Aldrich[®]. Cloreto de potássio, hidróxido de sódio, fosfato de sódio monobásico foram adquiridos junto a Isofar[®]. Ácido sulfúrico PA e álcool etílico (99,5%) foram adquiridos da Merck[®].

A soluções etanólicas de 11-MUA, 3-MPA bem como a solução de EDC-NHS foram preparadas previamente ao uso para evitar os efeitos associados às suas decomposições provocando reações indesejáveis. Todas as outras soluções foram preparadas utilizando água destilada e ultrapurificada através do sistema purificador de água osmose reversa da GEHAKA[®], modelo OS10LXE.

3.2 Equipamentos

Os testes de voltametria cíclica e impedância eletroquímica foram feitos utilizando um potenciostato/galvanostato da AUTOLAB[®] conectado a um computador com os softwares GPES para voltametria e FRA para impedância. Verificado na Figura 3.

Figura 3 - Potenciostato/galvanostato da AUTOLAB[®] utilizado nas medidas eletroquímicas



Fonte: Próprio autor

As medidas eletroquímicas foram realizadas em um sistema com: um célula de vidro com tampa em Teflon[®] de capacidade para 10,00 mL, três eletrodos, sendo o eletrodo de trabalho um eletrodo de ouro, um eletrodo de referência Ag/AgCl_(sat) em KCl e o contra-eletrodo um fio de platina, como verificado na Figura 4.

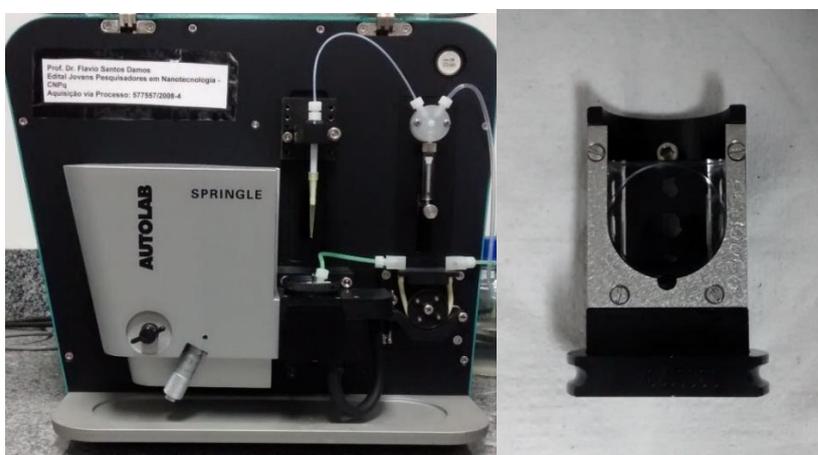
Figura 4 - Célula eletroquímica utilizada nos testes VC e EIE.



Fonte: Próprio autor

Para analisar as interações biomoleculares, utilizou-se um equipamento de SPR, modelo AUTOLAB[®] Springle, combinado a um prisma de vidro e um disco de vidro recoberto com um fino filme de ouro. O equipamento opera com um diodo de laser de He-Ne com emissão em um comprimento de onda de 670 nm, que utiliza um espelho vibratório para modular o ângulo de incidência do feixe de luz p-polarizada sobre o substrato de SPR. A intensidade da luz refletida é detectada por um fotodiodo. Utiliza-se a configuração de Kretschmann (baseada na reflexão interna total atenuada), que é a configuração mais utilizada em SPR. O equipamento de SPR e o prisma de vidro estão apresentados na Figura 5.

Figura 5 - Espectrômetro de SPR da AUTOLAB[®] Springle utilizado para as medidas ópticas (1) e prisma de vidro em que se colocava o eletrodo de disco de ouro (2).



Fonte: Próprio autor

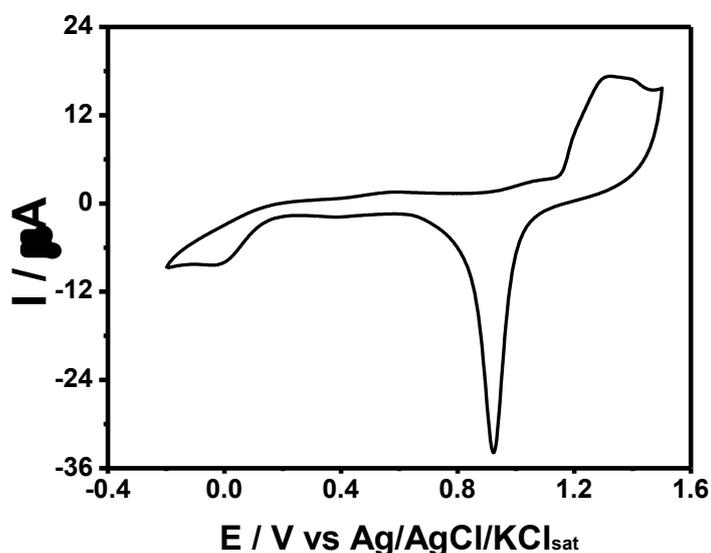
Os experimentos de Microscopia Eletroquímica de Varredura foram realizados utilizando um microscópio da marca Sensolytics (Bochum, Germany) acoplado a um bipotenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT 128 N da Eco chemie (Utrecht, Netherlands). As imagens e as curvas de aproximação foram feitas utilizando o modo de *feedback* do SECM em uma configuração com quatro eletrodos à temperatura ambiente que utiliza uma fase de tradução em três eixos conduzidos por 3 motores de passo (eixo x, y e z) para posicionar a tip. As sondas utilizadas foram ultramicroeletrodos (UMEs) de platina com raio a de 5 μm e $RG \sim 10$ (RG é a relação entre o raio da parte isolante (vidro), rg , e a parte condutora condutora (platina), então $RG=rg/a$) sendo aplicado neste um potencial de $-0,2\text{V vs Ag/AgCl}$, um potencial escolhido realizando voltametria cíclica com a sonda de Pt a $d > 500 \mu\text{m}$.

3.3 Limpeza do eletrodo de ouro

Um dos parâmetros importantes para a modificação de uma superfície com um tiol é a limpeza adequada do eletrodo ou disco de ouro. Assim, previamente à utilização, o disco de ouro foi imerso em solução "piranha", uma mistura de 30% de H_2O_2 e H_2SO_4 concentrado (na proporção 1:3, v/v) durante 2 minutos. Logo após, a superfície foi lavada abundantemente com água. Este procedimento de tratamento de superfície é amplamente utilizado, pois é capaz de produzir superfícies limpas, altamente reprodutíveis.

O eletrodo de ouro foi também limpo, eletroquimicamente, anteriormente à modificação da sua superfície com o tiol. O processo de limpeza consistia em polir mecanicamente a superfície de ouro em alumina. Em seguida, os voltamogramas cíclicos foram obtidos em solução de H_2SO_4 $0,5 \text{ molL}^{-1}$ a uma velocidade de varredura de 50 mVs^{-1} , no intervalo de potencial compreendido entre $-0,2$ a $1,5 \text{ V vs. Ag/AgCl}_{(\text{sat})}$ durante 20 ciclos para proporcionar a limpeza eletroquímica do eletrodo de trabalho. O voltamograma com o perfil típico de limpeza do eletrodo de ouro está apresentado na Figura 6.

Figura 6 - Voltamograma cíclico obtido para a superfície de ouro após limpeza em solução $0,5 \text{ molL}^{-1}$ de H_2SO_4 , com velocidade de varredura v de 50 mVs^{-1} , ΔE de $-0,2$ a $1,5 \text{ V}$ vs Ag/AgCl .



Fonte: Próprio autor

3.4 Construção e caracterização das monocamadas simples e mistas.

Para a formação da monocamada na superfície do eletrodo de ouro e do disco de ouro, os mesmos foram submersos em soluções etanólicas de 11-MUA, 3-MPA e em mistura de 11-MUA e 3-MPA (1:1). Foram testadas as monocamadas simples de 11-MUA e 3-MPA e a monocamada mista formada pela combinação desses dois tióis na proporção 1:1. A concentração utilizada foi de 1 mmolL^{-1} para cada tiol e o tempo de adsorção foi de 24 horas. Após essa etapa, o eletrodo era retirado da solução e levado para a célula eletroquímica.

A caracterização quanto a formação das monocamadas de 11-MUA e 3-MPA na superfície do eletrodo de ouro, foram realizadas pelas técnicas de VC, SECM, DR e EIE. Os voltamogramas foram feitos em solução aquosa contendo ferricianeto de potássio ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) 5 mmolL^{-1} e cloreto de potássio (KCl) $0,1 \text{ molL}^{-1}$, como sonda redox, utilizando o software GPES.

A dessorção redutiva, por meio da técnica de Voltametria de Pulso Diferencial, foi utilizada com o objetivo de dessorver as moléculas de 11-MUA e 3-MPA na superfície do eletrodo, usando o software GPES. Os voltamogramas foram obtidos em solução aquosa de KOH $0,1 \text{ molL}^{-1}$, a 20 mV/s . Previamente a esse procedimento, a solução de KOH fora desaerada com gás nitrogênio durante cerca de 10 minutos.

Os estudos de impedância também em solução aquosa contendo como sonda redox 5 mmolL⁻¹ de ferricianeto de potássio em 0,1 molL⁻¹ de KCl. As medidas foram feitas através do software FRA, em potencial aplicado (média das correntes de pico anódico e catódico obtidos pelos voltamogramas, a uma velocidade de varredura de 25 mV/s) e em potencial de circuito aberto (OCP – Open Circuit Potential), com faixa de frequência de 0,1 a 10⁵ Hz.

3.5 Ativação dos grupos funcionais da SAM

Para ativação dos grupos carboxílicos terminais da SAM foram injetados 500 µL de uma mistura aquosa contendo EDC-NHS (100 mmol L⁻¹ do 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e 150 mmol L⁻¹ de N-hidroxissuccinimida (NHS), em um tempo de 30 min.

3.6 Construção do imunossensor através da SPR

Para a construção do imunossensor foi realizada a imobilização do antígeno da proteína C8 sobre a SAMs de 11-MUA e 3-MPA na superfície do disco de ouro.

3.7 Adição de antígenos de proteína C8 sobre o disco de ouro e detecção da imunorreação entre antígenos de *Leishmania* e anticorpos anti-*Leishmania* via SPR

O sensor contendo a SAM previamente ativada foi colocado sobre o prisma de vidro do SPR. Em seguida, adicionou-se 100 µL do antígeno da proteína C8 de concentração 75 µg/mL na superfície do ouro e esperou-se 30 minutos. As medidas iniciavam-se com a injeção de 200 µL de tampão PBS pH 7,4 para a lavagem da superfície e obtenção de uma linha de base. Trabalhou-se neste pH por ser um valor próximo ao pH fisiológico, e também por contribuir para preservação das amostras biológicas. Logo após a estabilização da linha de base, foram injetados sobre a superfície 60 µL do anti-*Leishmania*. Foram testadas as seguintes diluições do anticorpo anti-*Leishmania*: 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640 e 1:1280. A imunorreação entre o antígeno e o anticorpo foi visualizada através da mudança do ângulo de SPR em função do tempo de interação. Posteriormente à adição dos antígenos, a superfície foi lavada várias vezes com tampão PBS pH 7,4 para remover o excesso de antígeno não-ligante.

3.8 Produção do antígeno recombinante de *Leishmania infantum*

a) Seleção

A proteína recombinante foi selecionada de acordo com quatro diferentes critérios. i), não ter sido previamente descrito na literatura exceto em anotações automáticas de genomas de sequência do tripanossomatidae e suas pesquisas (FARIAS *et al.*, 2011). ii), observado das proteínas em espécies de *Leishmania*. iii), deve apresentar epitopos célula B da predição de dois softwares simultaneamente (BCPreds e ABCPred) (FONSECA *et al.*, 2014). iv), epitopos que não poderia reagir com o soro canino infectado com *Tripanosoma cruzi* nem com soros caninos saudáveis em imunotransferência foram mapeados; conseqüentemente, seus epitopos devem ser altamente imonogênico quando testado com soro canino infectando com *L. infantum* (FARIAS *et al.*, 2011). A proteína estudada no artigo foi nomeada hipoteticamente como proteína C8.

b) Produção da proteína recombinante

O nucleotídeo e a sequência de ácido amino usado no estudo foi obtido do Centro Nacional de Informações Biológicas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Inicialmente, o DNA genômico foi extraído da *L. infantum* (MHOM/BR/1972/BH46) usando o mini kit de DNA QIAamp (QIAGEN) e usado como modelo no PCR. A exportação e os primers reversos, foram projetados usando o software Oligo Explorer 1.4 (www.genelink.com/tools/gl-oe.asp) e o Primer Premier 5.0 (www.premierbiosoft.com/primerdesign/). A reação de amplificação foi realizada seguindo as seguintes condições: primeira desnaturação a 94°C por 5 min seguida por 25 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 54°C (C1 e C8) por 1 min e extensão a 72°C por 1 min, e uma extensão final por 5 min.

O produto da PCR foi clonado no site de restrição NheI/HindIII do vetor pET-28^a-TEV, no qual habilitou um resíduo de 6 tags de histidina para ser fundido com a proteína. Depois, células eletrocompetentes de *Escherichia coli* (BL21 strain) foram transformadas com o plasmídeo recombinante. Para alcançar a expressão proteica, uma única colônia foi crescida em média 2xYT (1,6% Bactotryptone, 1% yeast extract, 0,5 NaCl) contendo kanamicina 0,05 mg mL⁻¹ por 16h. Esta cultura foi incubada em 1 L de 2xYT fresco com kanamicina, mantendo sobre algumas condições acima descritas e induzidas com 0,5 mmolL⁻¹ de IPTG (isopropyl-β-

D-thiogalactopyranoside) onde a cultura atingiu uma densidade ótica de 0,6 a 600 nm. O cultivo foi realizada por 4 h a 37°C, e as células foram então lisadas por cinco passagem através de um homogeneizador (EmulsiFlex™ C3). Depois, a proteína recombinante foi purificada usando uma coluna HIS-trap de 5 mL (GE Healthcare Life Science) acoplada a um sistema cromatográfico ÄKTA Prime (GE Healthcare Life Science).

c) Soro Canino

As amostras de soro positivo de LVC foram coletadas de cães infectados naturalmente com antígeno *L. infantum* de regiões endêmicas de Belo Horizonte, Brasil. Para essas amostras, os diagnósticos foram feitos por métodos sorológicos IFAT e ELISA no Laboratório de Leishmaniose da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brasil. Para o controle negativo, as amostras de soro canino foram obtidas de cães sadios obtidas em áreas não endêmicas. Os procedimentos foram realizados de acordo com o comitê de ética em uso de animais (Ethics Committee in the Use of Animals/Federal University of Minas Gerais), obtido aprovação sob o número de protocolo 161/2013.

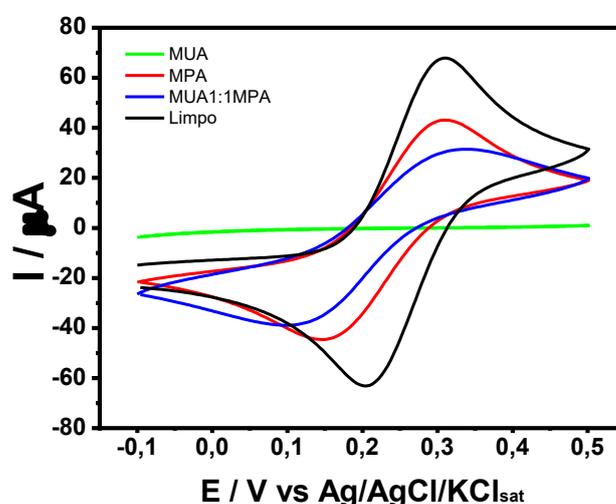
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização das monocamadas auto-organizadas simples e mistas de ácido 11-mercaptoundecanoico e ácido 3-mercaptopropiônico por Voltametria Cíclica (VC) e Microscopia Eletroquímica de Varredura (SECM)

A Voltametria Cíclica (VC) tem sido amplamente utilizada para avaliar as características eletroquímicas das SAMs confeccionadas sobre superfícies metálicas (ECKERMANN *et al.*, 2011). Segundo Chidsey e Loiacono (1990) a avaliação de processos redox de sondas eletroquímicas, como o hexacianoferrato de potássio ($K_3[Fe(CN)_6]$), trata-se de uma ferramenta importante e útil no monitoramento de superfície metálica modificadas com moléculas de cadeias carbônicas com natureza hidrofóbicas.

Assim, para avaliar as características voltamétricas resultantes das SAMs de 11-MUA e 3-MPA na superfície do eletrodo de ouro utilizou-se a técnica de VC. Na figura 7 são apresentados os voltamogramas cíclicos obtidos para o eletrodo de ouro limpo e modificado com monocamadas simples e mistas na proporção 1:1 de 11-MUA e 3-MPA. As monocamadas foram confeccionadas mediante exposição dos substratos metálicos às soluções dos tióis por 24 horas e, posteriormente, as medidas voltamétricas foram realizadas na presença da sonda redox ferricianeto de potássio (5 mmolL^{-1}) em $0,1 \text{ molL}^{-1}$ de KCl.

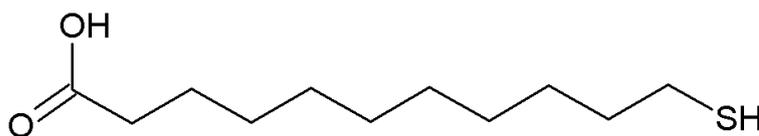
Figura 7 - Voltamogramas cíclicos obtidos para o eletrodo limpo e modificado com monocamadas simples de 11-MUA e 3-MPA e com a monocamada mista de 11-MUA e 3-MPA na proporção 1:1 (v/v). As SAMs foram confeccionadas a partir de soluções de concentração 1 mmolL^{-1} e incubadas pelo período de 24 horas. Todos os VCs foram obtidos em 5 mmolL^{-1} de ferricianeto de potássio em $0,1 \text{ molL}^{-1}$ de KCl a uma velocidade de varredura do potencial elétrico de 100 mVs^{-1} .



Fonte: Próprio autor

A partir dos voltamogramas apresentados na Figura 7, nota-se que o comportamento eletroativo da sonda redox é suprimido totalmente quando o substrato foi coberto com a monocamada de 11-MUA tendo em vista que a mesma inibe totalmente os processos faradaicos no sistema. Por ser um alcanotiol de cadeia longa, como visto da Figura 8, a monocamada de 11-MUA favorece a separação de cargas na dupla camada elétrica de forma a promover uma grande redução da capacitância da interface eletrodo/SAM/solução. Além disso, como descrito por Luz e colaboradores (2015) as espécies eletroativas em solução ficam mais distantes da superfície do eletrodo, o que reduz a velocidade de transferência eletrônica quando comparada com a superfície não modificada. Percebe-se então que a modificação da superfície de ouro com 11-MUA resulta na formação de uma SAM extremamente compacta e com eficiente capacidade de bloqueio do acesso da sonda redox à superfície metálica.

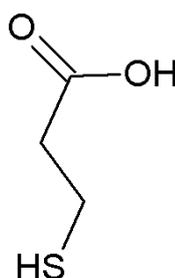
Figura 8 - Estrutura do tiol 11-MUA



Fonte: Próprio autor

Por outro lado, a SAM de 3-MPA apresentou uma menor capacidade de inibição do caráter dos processos redox da sonda eletroativa. Por ser um tiol de cadeia curta, como visto na Figura 9, essa monocamada não foi capaz de evitar que os processos faradaicos da sonda redox ocorram, os quais podem ocorrer tanto via os defeitos presentes na SAM bem como via tunelamento quântico de elétrons através da cadeia carbônica dos alcanotióis até a superfície do eletrodo (LUZ, 2014).

Figura 9 - Fórmula estrutural do tiol 3-MPA



Fonte: Próprio autor

Para a monocamada mista, na proporção 1:1, tem-se um comportamento eletroquímico intermediário em comparação às monocamadas simples. De acordo com Coelho (2011) o perfil voltamétrico da SAM mista apresenta contribuições de transporte de massa linear semi-infinito (característico de eletrodos convencionais) e hemisférico semi-infinito (característico de ultramicroeletrodos).

Dentre os parâmetros eletroquímicos envolvidos no processo transferência eletrônica na interface eletrodo/solução, a constante de transferência eletrônica heterogênea aparente, k_{app}^0 , reflete quantitativamente a natureza dos processos redox da sonda na interface eletrodo/solução. Neste sentido, o valor de k_{app}^0 tem sido comumente estimado mediante o uso de uma sonda de transferência de elétrons da esfera externa (como por exemplo, o ferricianeto de potássio) mediante o registro de sucessivos voltamogramas cíclicos a diferentes velocidades de varredura. A determinação do k_{app}^0 por voltametria cíclica é realizada mediante o emprego do método de Nicholson a partir dos potenciais de pico de oxidação e redução e das respectivas velocidades de varredura do potencial elétrico. Embora o método de Nicholson tenha sido amplamente usado para determinar as constantes de velocidade de reações de transferência de elétrons quase reversíveis, ele deve ser empregado judiciosamente para evitar resultados totalmente errôneos (SILVA *et al.*, 2014). Dentre os possíveis erros que podem tornar a estimativa dos valores de k_{app}^0 incerta inclui-se a queda ôhmica de potencial (iR), a qual pode contribuir para o aumento da separação entre os picos de oxidação e redução causando uma estimativa errônea da constante de velocidade.

Neste sentido, a microscopia eletroquímica de varredura (SECM) foi empregada na obtenção dos valores de k_{app} para os processos eletroquímicos do ferricianeto frente aos eletrodos modificados com as diferentes SAMs propostas. A técnica SECM tem várias vantagens sobre a voltametria cíclica para medir a cinética de transferência de elétrons, incluindo: (i) a corrente desenvolvida no ultramicroeletrodo é muito pequena e as medidas são registradas no estado estacionário, então são encontrados poucos problemas com a queda iR no interior da solução; (ii) tendo em vista que a resposta da SECM é uma função da velocidade da reação no substrato, ela pode ser usada para mapear a reatividade química espacial do sistema investigado bem como avaliar os aspectos eletroquímicos locais característicos da superfície. Portanto, a constante de velocidade heterogênea aparente, k_{app}^0 , entre o eléctrodo e o par redox foi avaliada por SECM.

O potencial aplicado ao ultramicroeletrodo foi ajustado para um valor no qual a redução eletroquímica da sonda redox ($[Fe(CN)_6]^{3-}$) ocorre sob controle difusional ($E_{tip} = -0.2$ V vs

Ag/AgCl) enquanto que o potencial das plataformas modificadas com cada SAMs foi progressivamente fixado em valores mais positivos. Este procedimento foi realizado com o propósito de obtermos uma gama de valores de constante de transferência de elétrons heterogênea aparentes (k_{app}) em função do potencial do substrato. A Figura 10 apresenta as curvas de aproximação obtidas para as SAMs de MPA, MUA e MPA-MUA.

À medida que o ultramicroeletrodo é movido em direção ao substrato polarizado nos diferentes potenciais, o produto da redução do ferricianeto de potássio é regenerado em diferentes proporções dependendo da natureza do filme sobre o substrato. As constantes de transferência eletrônica heterogênea aparente (k_{app}) para cada substrato polarizado em vários potenciais foram obtidas usando as seguintes equações:

$$I_T^k = \left(\frac{0.78377}{L \left(1 + \frac{1}{\Lambda}\right)} + \frac{[0.68 + 0.3315 \exp\left(-\frac{1.0672}{L}\right)]}{[1 + F(L, \Lambda)]} \right) \left(1 - \frac{I_T^{ins}}{I_T^C}\right) + I_T^{ins} \quad (1)$$

onde I_T^{ins} e I_T^C representam as correntes da tip para substrato isolante e condutor, respectivamente. As expressões destas correntes como uma função da distância entre a tip e o substrato são normalizadas (Souto et al 2013).

$$I_T^C = \frac{0.78377}{L} + 0.3315 \exp\left(-\frac{1.0672}{L}\right) + 0.68 \quad (2)$$

$$I_T^{ins} = \frac{1}{0.15 + \frac{1.5358}{L} + 0.58 \exp\left(-\frac{1.14}{L}\right) + 0.0908 \exp\left[\frac{L-6.3}{1.017L}\right]} \quad (3)$$

onde $L=d/a$ e $\Lambda = k_{eff} d/D$, k_{eff} é a constante heterogênea limite aparente, D é o coeficiente de difusão, d é a distância da tip para o substrato, a raio do microeletrodo e $F(L, \Lambda) = [(11+7.3\Lambda)/\Lambda]/[(110-40L)]$.

As constantes de velocidade aparentes foram ajustadas à equação de Butler-Volmer para obtenção da constante de velocidade heterogênea (Souto et al 2013).

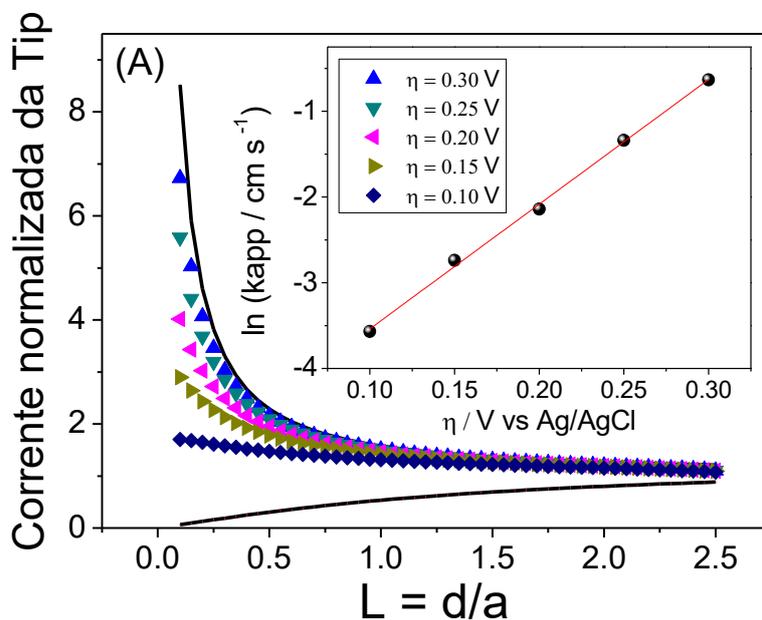
$$k_{eff} = k^0 \exp[-\alpha f(E_s - E^0)] \quad (4)$$

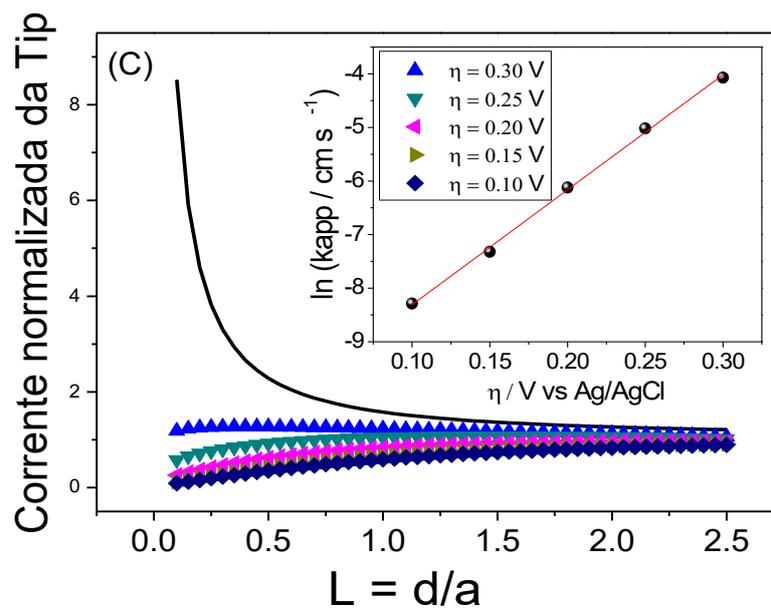
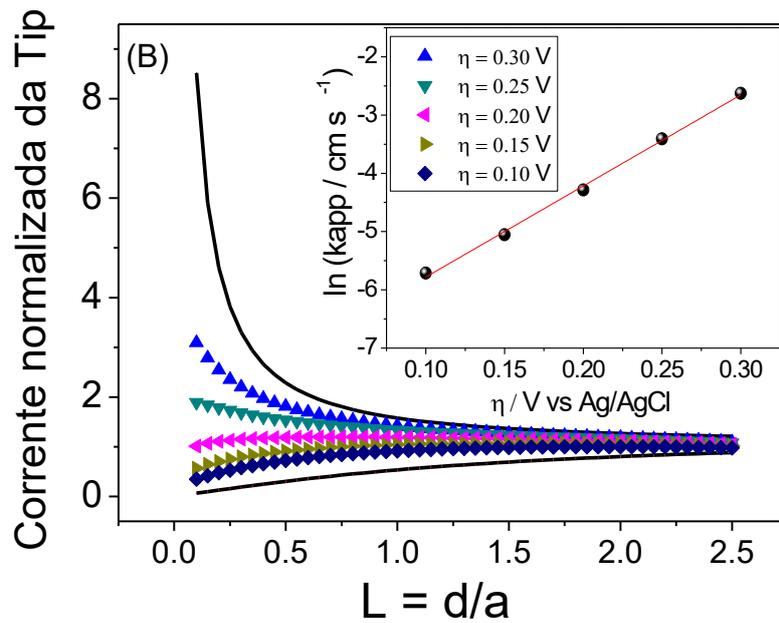
onde $f = F/RT$, F é a constant de Faraday, R é a constant dos gases e T é a temperatura.

Como pode ser visto na Figura 10, o substrato modificado com a SAM de MPA (Figura 10(A)) mostra um desvio do feedback negativo em potenciais mais baixos em comparação ao substrato modificado com a SAM de MUA (Figura 10 (C)). Por outro lado, a curva de aproximação para a SAM mista de MPA/MUA (Figura 10 (B)) apresentou comportamento intermediário entre a observada para as SAMs mistas.

Os valores de k_{app} para o eletrodo modificado com a SAM de MPA foram maiores que os obtidos para o substrato modificado com a SAM mista, que por sua vez apresentou valores superiores ao observado para a MUA, o que é consistente com os experimentos de voltametria cíclica. A constante de velocidade aparente obtida foi ajustada à equação 4 e valores de k_{app}^0 de $7.25 \times 10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$, $6.50 \times 10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$ e $2.15 \times 10^{-5} \text{ cm s}^{-1}$ foram obtidos para os eletrodos modificado com as SAMs de MPA, mista e MUA, respectivamente.

Figura 10 - Curva de aproximação SECM obtida para substrato modificado com (A) SAM de MPA, (B) SAM de mista MPA-MUA e (C) SAM de MUA em $\text{KCl } 0.1 \text{ mol L}^{-1}$, contendo $1 \text{ mmol L}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$. A Tip foi polarizada em -0.2 V o substrato foi submetido a diferentes sobrepotenciais (1) 0.1, (2) 0.2, (3) 0.3, (4) 0.4 e (5) 0.5 V vs. Ag/AgCl . A figura inserida mostra o gráfico da constante de velocidade aparente *vs* sobrepotencial do substrato. A linha mostra os dados ajustados à teoria de Butler-Volmer.



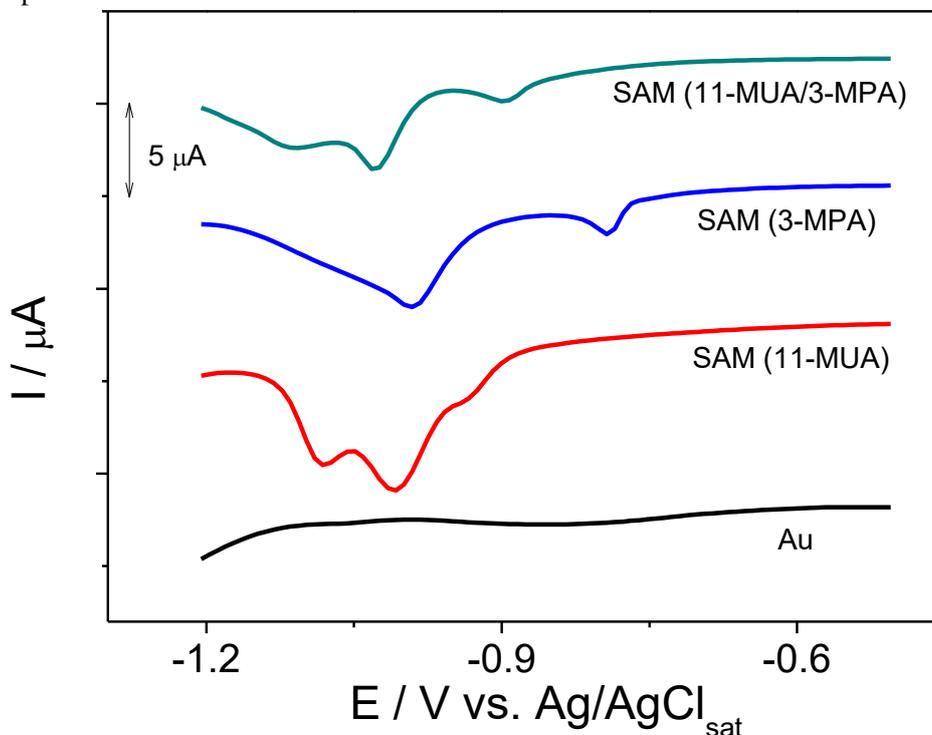


Fonte: Próprio autor

4.2 Caracterização das monocamadas auto-organizadas simples e mistas de ácido 11-mercaptopundecanoico e ácido 3-mercaptopropiônico por Dessorção Redutiva (RD)

Na Figura 11, podemos verificar os voltamogramas de pulso diferencial (VPD) obtidos para os eletrodos com as monocamadas simples e mistas de 11-MUA e 3-MPA no eletrólito KOH $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, a uma velocidade de 20 mVs^{-1} em um intervalo de potencial entre -0.2 e $-1.3 \text{ V vs. Ag/AgCl}$. Antes de iniciar os experimentos, a solução foi desareada com gás nitrogênio (N_2).

Figura 11 - RD obtida através da técnica de VPD. Voltamogramas obtidos para as monocamadas simples e mistas de 11-MUA e 3-MPA, após 24 h de adsorção. Todos os voltamogramas foram obtidos em solução aquosa contendo $0,1 \text{ molL}^{-1}$ de KOH, v de 20 mVs^{-1} e ΔE de $0,1$ a $-1,3 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl. Anteriormente a realização das medidas a solução aquosa de KOH foi desaerada com gás nitrogênio durante aproximadamente 10 min.



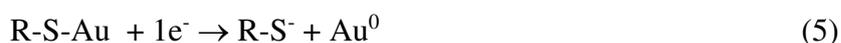
Fonte: Próprio autor

O voltamograma referente à redução dessortiva da SAM mista 11-MUA/3-MPA apresentaram 3 picos catódicos nos potenciais de $-0,9 \text{ V}$, $-1,03 \text{ V}$ e $-1,11 \text{ V}$, indicando domínios de redução dessortiva característicos da 11-MUA e do 3-MPA.

A presença de múltiplos picos de dessorção redutiva da SAM mista pode ser consequência da formação de regiões com domínios de fase diferentes na superfície do metal (KAWAGUCHI *et al.*, 2000). Em geral, os domínios de fase correspondem a diferentes formas de organização da SAM, apresentando as energias de adsorção e dessorção própria. (KAWAGUCHI *et al.*, 2000).

Desse modo, a dessorção de diferentes fases acaba ocorrendo em diferentes potenciais, visto que a dessorção de monocamadas de tiois é característica para cada espécie adsorvida pois quanto mais compacta e estável é a monocamada maior é a energia necessária para sua dessorção redutiva (POIRIER *et al.*, 1996).

A redução dessortiva de alcanotiois sobre ouro é representada pela seguinte reação:



A partir da intensidade da corrente de pico catódica obtida para cada monocamada nos voltamogramas de VPD, foi possível determinar a cobertura de superfície através da equação 5.

$$\Gamma = \frac{Q}{n \cdot F \cdot A} \quad (6)$$

onde “Q” corresponde à carga associada à redução das espécies na superfície do eletrodo de ouro, a qual pode ser determinada através da integral da curva *i vs E*. “n” é o número de elétrons envolvidos na reação, neste caso 1 (ADAMS *et al.*, 2003); F é a constante de Faraday (96.485,4 Cmol⁻¹) e A é a área geométrica do eletrodo (0,0314 cm²).

De acordo com a Tabela 1, a solução de 11-MUA a 1,0 mmolL⁻¹ foi a que apresentou o maior valor de Γ (225,568 pmolcm⁻²), o que mostra que nessa condição, o tiol foi mais intensamente adsorvido na superfície do eletrodo.

Tabela 1 - Valores de intensidade de quantidade de carga (Q) e cobertura de superfície (Γ) obtidos para eletrodos de ouro modificados na concentração 1mmolL⁻¹ de 11-MUA e 3-MPA, em solução 0,1 molL⁻¹ de KOH e após tempo de interação de 24 horas. Os voltamogramas foram obtidos a uma velocidade de 20 mVs⁻¹.

SAM	Integral do Pico 1	Integral do Pico 2	Integral do Pico 3	Q x 10 ⁻⁸ (P1+P2+P3)	Γ (pmolcm ⁻²)
3-MPA (1mmolL ⁻¹)	23,815	8,5721	0	32,4	106,901
11-MUA (1mmolL ⁻¹)	6,085	62,254	0	68,3	225,568
1MUA: 1MPA (1mmolL-1)	4,676	9,6509	6,4896	20,8	68,7094

Fonte: Próprio autor

As SAMs simples de 11-MUA e 3-MPA em comparação à SAM mista 11-MUA/3-MPA apresentaram maior recobrimento de superfície associado a ligações enxofre-ouro. Em geral, as SAMs podem formar três tipos de domínios de fase: α , β e ϵ . A fase α apresenta elevado índice de interações entre átomos de enxofre fazendo que a cadeia carbônica esteja predominantemente paralela ao plano superficial do substrato. As fases β , por sua vez, resulta de interações entre os grupos “cabeça” dos tiois (no presente caso, grupos carboxílicos) de

forma que se formam agregados de tióis gerando sobreposição de moléculas. A fase ε é caracterizada por forte interação lateral entre as cadeias carbônicas resultando em monocamadas compactas e ordenadas (POIRIER *et al.*, 1996).

Do exposto, é provável que a interação entre os grupos cabeça dos tióis envolvidos na formação da SAM mista tenha promovido grande formação de fases α e β em relação à fase ε de forma a reduzir a quantidade de tióis sobre o substrato e, conseqüentemente, resultando em menores valores de cobertura de superfície. Contudo, cabe ressaltar que, neste nível de estudo, não é possível afirmarmos que a SAM mista tenha predominância de “ilhas” de moléculas segregadas de um mesmo tiol ou se predomina uma SAM mista de moléculas intercaladas. Segundo a literatura, organizados moleculares mistos formados por “ilhas” de um mesmo tiol apresentam melhor exposição dos sítios ativos e menor interferência de efeitos de impedimento estérico de forma a possibilitar uma melhor imobilização de diferentes biomoléculas, tais como DNA, enzimas, antígenos ou anticorpos, na superfície dos grupamentos terminais (ADAMS *et al.*, 2003; SABATINI *et al.*, 1987). Neste sentido, são apresentados a seguir estudos comparativos da interação entre antígenos de *L. infantum* e as diferentes SAMs.

4.3 Caracterização das monocamadas auto-organizadas simples e mistas de ácido 11-mercaptoundecanoico e ácido 3-mercaptopropiônico por Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE)

A técnica de EIE fornece uma visão completa e detalhada das características elétricas da interface eletrodo/solução (CARVALHO *et al.*, 2006). A EIE consiste na aplicação de uma perturbação senoidal de tensão de pequena amplitude a uma determinada frequência de forma que seja possível investigar o sistema em estado estacionário já que tais condições de perturbação do sistema são mínimas. De forma geral, a impedância de um sistema é representada por um vetor composto por uma parte real [$Z_{re(\omega)}$] e por uma parte imaginária [$Z_{im(\omega)}$], onde $i=(-1)^{1/2}$ (Souto, 2012). Desta forma a impedância complexa é representada pelas equações 7 e 8.

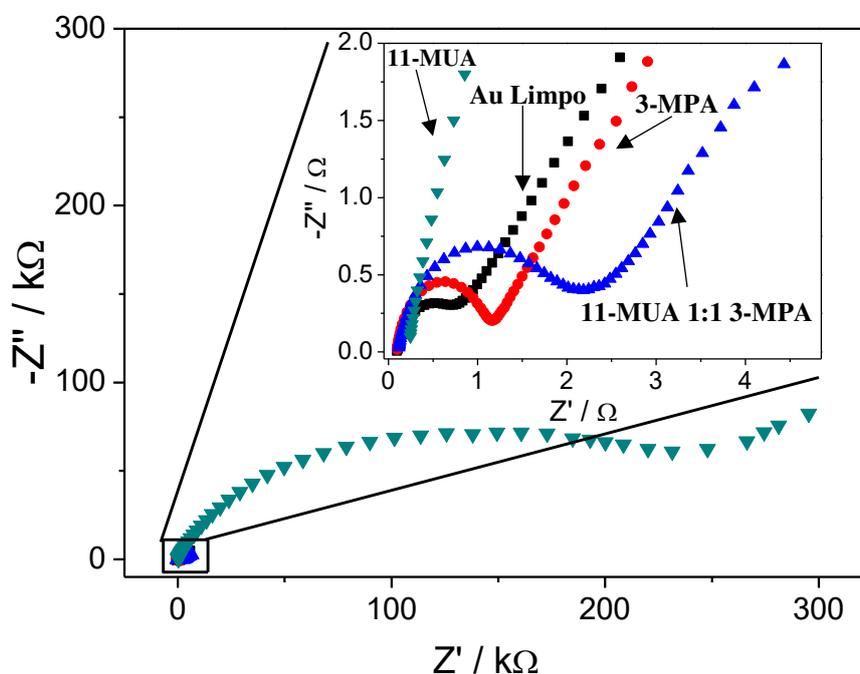
$$Z_{(\omega)} = Z_{re(\omega)} + iZ_{im(\omega)} \quad (7)$$

$$Z_{(\omega)} = Z'_{(\omega)} + iZ''_{(\omega)} \quad (8)$$

A representação de dados de EIE pode ser feita de várias formas, sendo o Diagrama de Nyquist (gráficos de Z' vs. Z'') muito utilizado, sendo uma poderosa ferramenta para mensurar a resistência à transferência eletrônica (R_{ct}) em reações eletroquímicas (CHEN *et al*, 2010).

Para obter mais informações a respeito da resistência a transferência eletrônica, foram feitos estudos de caracterização das monocamadas por EIE. A Figura 12 mostra os diagramas de Nyquist obtidos para o eletrodo de ouro modificado com as SAMs simples e mistas de 11-MUA e 3-MPA, após um período de imersão do eletrodo nas soluções por um período de 24 h.

Figura 12 - Diagramas de Nyquist para eletrodo de ouro modificado com SAM simples de 11-MUA, 3-MPA e mista dos mesmos tióis na proporção 1:1 frente à sonda redox hexacianoferrato de potássio 1 molL^{-1} em KCl $0,1 \text{ molL}^{-1}$. Espectroscopia de Impedância Eletroquímica feita em sistema aberto.

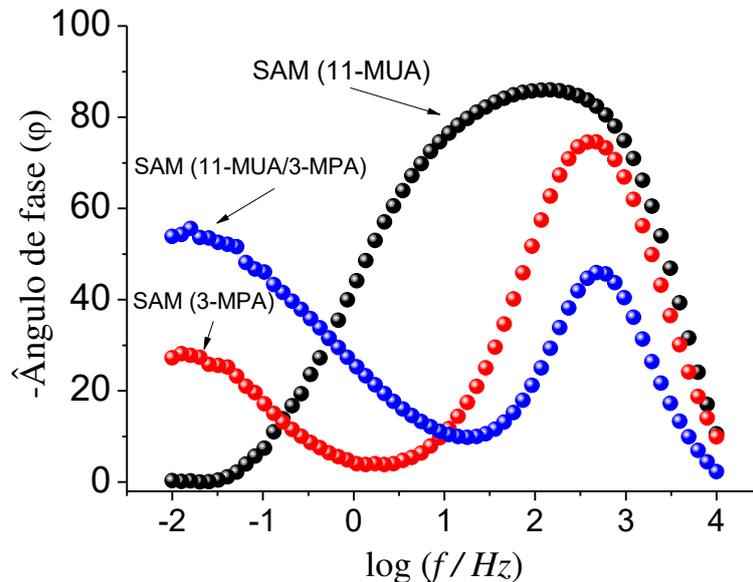


Fonte: Próprio autor

Os espectros de impedância incluem um semicírculo a frequências mais elevadas correspondente ao processo de transferência de elétrons e uma parte linear nas baixas frequências resultante da difusão de espécies em solução. O diâmetro do semicírculo nos diagramas de Nyquist está associado à resistência à transferência de cargas na interface eletrodo modificado/solução e tal medida tem sido usada para descrever as propriedades eletroquímicas da região interfacial. A Figura 12 deixa evidente que o diâmetro do semicírculo aumenta na seguinte ordem: Au-limpo < SAM 3-MPA < SAM mista 11-MUA/3-MPA << SAM 11-MUA. Na Figura 13 são apresentados os ângulos de fase em função dos logaritmo das frequências,

obtidos das medidas de impedância eletroquímica no intervalo de frequência compreendido entre 10^4 Hz a 10^{-2} Hz para as SAMs de 3-MPA, 11-MUA/3-MPA e 11-MUA.

Figura 13 - Ângulo de fase em função do logaritmo da frequência para as SAMs de 11-MUA, 3-MPA e 11-MUA/3-MPA (1:1).



Fonte: Próprio autor

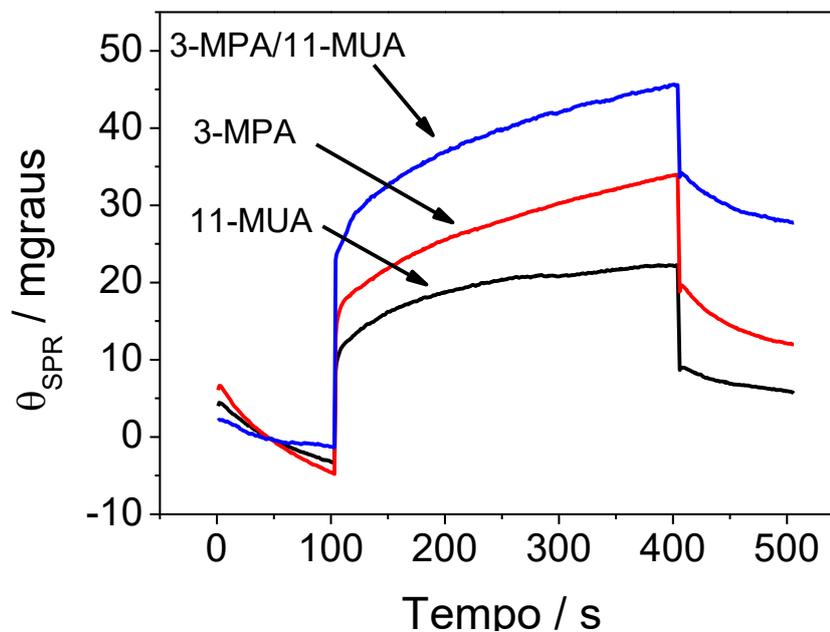
Do ponto de vista teórico, as SAMs seguem o modelo de capacitor ideal de Helmholtz, quando a frequência é 1 Hz o ângulo de fase é -90° (MACDONALD, 1987). Contudo, do ponto de vista prático, uma SAM cujo ângulo de fase é superior a 88° na região de frequência compreendida entre 1 Hz e 10^3 Hz é considerada um capacitor ideal (CAMPUZANO *et al.*, 2006). Neste sentido, a SAM de 11-MUA por assumir ângulo de fase superiores a 88° , é a que mais se aproxima de um capacitor ideal no intervalo de frequência compreendido entre 10 Hz e 1000 Hz. Por outro lado, a SAM de 3-MPA apresenta um comportamento intermediário ao das SAMs simples de 11-MUA e mista de 11-MUA/3-MPA, o que é típico de SAMs que utilizam tióis de cadeias curtas o qual apresentam bom grau de ordem interfacial. Adicionalmente, a SAM mista 11-MUA/3-MPA apresenta valores de ângulos de fase que são baixos na região de frequência compreendida entre 10 Hz e 1000 Hz SAMs quando comparado com as SAMs simples de 11-MUA e 3-MPA, caracterizando um menor grau de ordenação interfacial.

4.4 Construção do Imunossensor e Avaliação de sua capacidade de discriminação de soros positivos e negativos de *L. Infantum* por SPR

Com o propósito de avaliar a potencialidade de cada SAM no que tange às suas capacidades de imobilização de antígenos de *L. Infantum* cada uma das diferentes SAMs foi exposta a antígenos solúveis de *L. Infantum* e o ângulo de SPR foi monitorado em função do tempo. Inicialmente, cada SAMs foi exposta a soluções de EDC-NHS com o propósito de ativar a superfície das SAMs (Hermanson, 2008). Depois da ativação das SAMs, as mesmas foram expostas a solução do antígeno *L. Infantum*. Na Figura 14 são apresentados os sensorgramas obtidos para uma mesma concentração do antígeno de *L. Infantum* sobre o disco sensor modificado com as monocamadas simples e mistas de 11-MUA e 3-MPA previamente ativadas.

Conforme pode ser observado nos sensorgramas apresentados na Figura 14, as SAMs simples e mistas interagiram com os antígenos *L. Infantum*, contudo a SAM mista 11-MUA:3-MPA resultou em maiores deslocamentos dos ângulos de SPR indicando que esta última interage mais intensamente com o antígeno de *L. Infantum* (Figura inserida à Figura 14 (B)).

Figura 14 - Sensorgramas referentes ao deslocamento de ângulo de SPR para as SAMs (11-MUA, 3-MPA e 11-MUA:3-MPA) com antígenos de *L. Infantum* imobilizado sobre a superfície ativada com EDC-NHS.



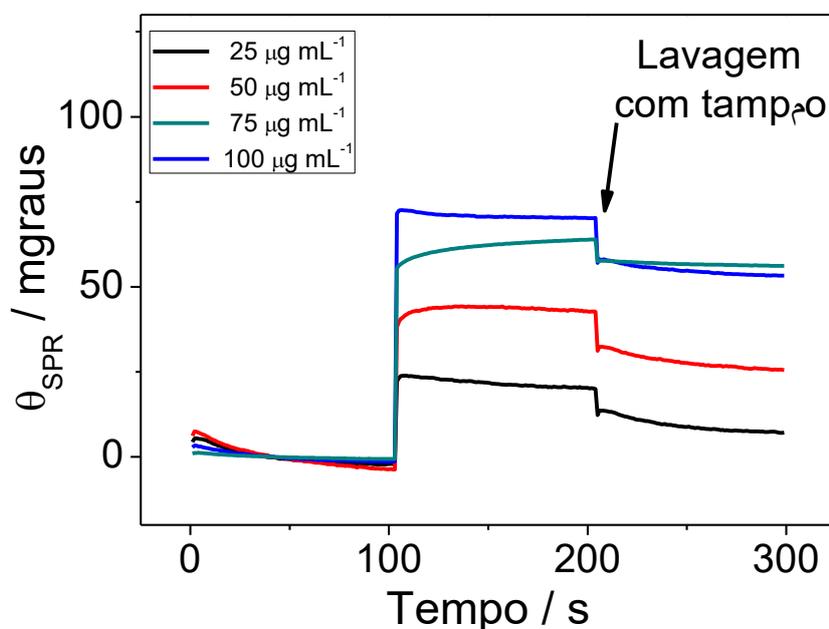
Fonte: Próprio autor

Tal resultado é consistente com a literatura, a qual descreve que organizados moleculares mistos de cadeias curtas e longas apresentam maior exposição dos sítios ativos e menor efeito de impedimento estérico (VERICAT *et al.*, 2010; LEE *et al.*, 2005). Portanto, a SAM mista 11-MUA/3-MPA (1:1) foi empregada como plataforma para os ensaios posteriores de imobilização dos antígenos de *L. Infantum* visando o desenvolvimento do imunossensor.

Após a escolha da SAM a ser utilizada para modificação dos discos de SPR, foram realizados estudos da interação da SAM mista 11-MUA/3-MPA (1:1) ativada com EDC-NHS frente a soluções de diferentes concentrações dos antígenos de *L. Infantum* (25, 50, 75 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (Figura 15). Após cada adição do antígeno de *L. Infantum* sobre a plataforma foi realizada lavagem do sistema com tampão fosfato (Figura 15).

Conforme pode ser observado, o aumento na concentração do antígeno de *L. Infantum* é acompanhado pelo aumento do ângulo de SPR como resultado do aumento do índice de refração local na superfície do disco sensor devido à presença de maior número de moléculas na superfície. Tal resultado é indicativo da grande eficiência da SAM mista confeccionada para imobilizar os antígenos de interesse.

Figura 15 - Sensorgramas referentes à interação do antígeno de *L. Infantum* com a SAM mista ativada a partir de soluções de diferentes concentrações do antígeno (25; 50; 75 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$). O deslocamento do ângulo de SPR ($\Delta\theta_{\text{SPR}}$) foi monitorado durante 5 minutos.



Fonte: Próprio autor

Conforme pode ser observado na Figura 15, é evidente que concentrações superiores a 75 $\mu\text{g mL}^{-1}$ do antígeno de *L. Infantum* não resultaram em maiores deslocamentos do ângulo de

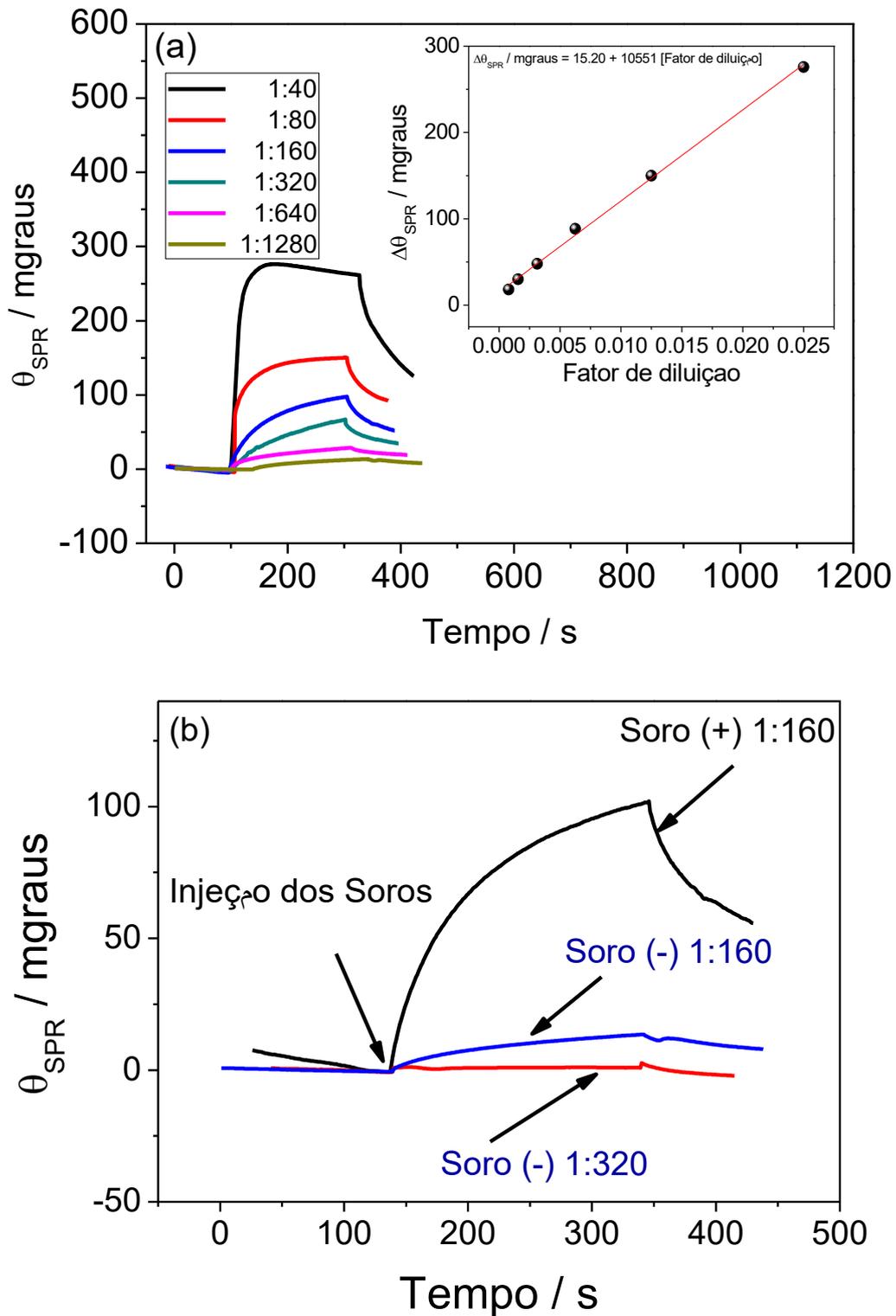
SPR de forma que os sensores subsequentes foram confeccionados mediante o emprego de soluções $75 \mu\text{g mL}^{-1}$ de *L. Infantum*.

Por fim, a eficiência do imunossensor baseado em SPR foi avaliada através da adição de soros caninos positivos e negativos sobre a superfície do imunossensor. Os sensorgramas mostrados na Figura 16 descrevem a etapa de associação devido à interação antígeno-anticorpo. É possível observar na Figura 16 o intervalo de diluições do soro para os quais o sensor é sensível ao anti-*L. infantum*.

Neste sentido, foram injetados soros caninos positivos e negativos de *L. Infantum* a diferentes diluições e, conforme pode ser observado, a resposta do imunossensor diminui à medida que a concentração dos anticorpos é diminuída (aumentando a diluição do soro), devido ao baixo número de interações de anticorpos no imunossensor. As curvas 1, 2, 3, 4, 5 e 6 referem-se às seguintes diluições dos soros: 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640 e 1:1280. A curva de calibração foi construída usando o logaritmo do fator de diluição versus o deslocamento do ângulo de SPR ($\Delta\theta_{\text{SPR}}$). A curva de calibração exibiu comportamento linear no intervalo de diluições compreendido entre 1:1280 a 1:40 com um valor de 0,998 para o coeficiente de correlação.

Além disso, a adição de soro negativo em diluições (de 1:40 a 1:1280) foi acompanhada por uma resposta menor quando comparado com o soro positivo (Figura 16 (b)), no qual apresenta os sensorgramas para as diluições de 1:160 de soro negativo e positivo. Conforme pode ser observado, para o soro negativo cuja diluição foi inferior a 1:320 não promoveram variações no ângulo de SPR, mostrando que, se a amostra de um indivíduo a ser analisado houver variação no ângulo de SPR nessa diluição, o mesmo poderá ser considerado infectado com a *L. infantum*.

Figura 16 - Sensorgramas de SPR mostrando a injeção de soro canino positivo imediatamente após a regeneração utilizando 1%(v/v) SDS. Em anexo (a) curva de calibração da interação d e diferentes diluições do soro canino positivo com o antígeno *L. infantum* imobilizado. (b) Comparação das injeções de soro canino positivo e negativo na diluição de 1:160 na superfície do imunossensor.



Fonte: Próprio autor

Atualmente, o Ministério da Saúde do Brasil estabelece formalmente que um animal é considerado reagente quando reativos para fatores de diluição é igual ou superior a 1:40 em ELISA e RIFI. Porém, tal critério ainda é controverso considerando que para vários autores apenas o fator de diluição igual ou maior que 1:160 deve ser conclusivo (SOUTO *et al.*, 2013). No entanto, neste fator de diluição a falha em demonstrar a infecção por ELISA e RIFI em cães assintomáticos é mais acentuada e a diluição mais elevada também pode mostrar perda de especificidade nos referidos métodos. Neste sentido, o resultado obtido no presente estudo indica o sucesso no desenvolvimento de um sensor baseado em SPR, apresentando vantagens quando comparado com as técnicas convencionais, tais como, excelente sensibilidade para detecção de anticorpos anti-*L. infantum*, análise de tempo curto e detecção em tempo real. Portanto, o imunossensor baseado em SPR preparado, mostra uma perspectiva grande de um sistema de detecção para o diagnóstico de LV.

5 CONCLUSÕES

O presente trabalho deixa evidente a potencialidade da combinação de antígenos recombinantes de *L. Infantum*, monocamadas auto-organizadas de tióis orgânicos e SPR como sistema de transdução para detecção de anticorpos anti-leishmania infantum. A ativação dos grupos carboxílicos terminais da SAM feita mediante o emprego de EDC-NHS se mostrou indispensável para imobilização dos antígenos solúveis de *L. infantum*. Após sucesso na construção e caracterização do imunossensor, a etapa envolvendo adição de soros caninos positivos e negativos para Leishmaniose Visceral sobre o sensor foi obtida de modo satisfatório. O imunossensor apresentou alta sensibilidade para detecção de anticorpos anti-*L. infantum* devido uma variação brusca no ângulo de SPR observado após injeção de soros caninos positivos em diferentes diluições. Uma vez que a adição de soros caninos negativos não foi acompanhada por variações significativas no ângulo de SPR em comparação a dos soros positivos pode-se concluir que o imunossensor também apresentou boa seletividade.

Portanto, o imunossensor fundamentado em SPR para detecção de anticorpos anti-leishmania infantum através da imobilização covalente do antígeno recombinante C8 mostrou ser uma ferramenta de grande potencial e aplicação, uma vez que, diferentemente dos métodos convencionalmente empregados em diagnósticos da LV, o sensor proposto não utiliza marcadores químicos e/ou biológicos para detecção, além de permitir análise em tempo real, sendo, portanto, um dispositivo que apresenta grande perspectiva como um novo método de detecção da LV em áreas endêmicas, podendo garantir um diagnóstico mais rápido e mais seguro nessas áreas.

REFERÊNCIAS

- ___BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde.
- ___SES- Secretaria de Estado da Saude: Governo orienta a população sobre as Leishmanioses
Governo do Estado do Maranhão
<http://www.ma.gov.br/governoorientaapopulacaosobreasleishmanioses/> acessado em:
13/01/2017
- ___WHO | Leishmaniasis< <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>> acessado em:13/01/2017.
- ABBASI, I., KIRSTEIN, O. D., HAILU, A., WARBURG, A. Optimization of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for the detection of *Leishmania* DNA in human blood samples. **Acta Tropica.**, v. 162, p. 20–26, 2016.
- ADAMS, D.M., BRUS, L., CHIDSEY, C.E.D., CREAGER, S., CREUTZ, C., KAGAN, C.R., KAMAT, P.V., LIEBERMAN, M., LINDSAY, S, MARCUS, R.A., METZGER, R.M., MICHEL-BEYERLE, M.E., MILLER, J.R., NEWTON, M.D., ROLISON, D.R., SANKEY, O., SCHANZE, K.S., YARDLEY, J., ZHU, X. Charge Transfer on the Nanoscale: Current Status. **J. Phys. Chem. B**, v. 107, p. 6668-6697, 2003.
- ANDRADE, R.A., ARAÚJO, M.S.S., REIS, A.B., GONTIJO, C.M.F., VIANNA, L.R., MAYRINK, W., MARTINS-FILHO, O.A. Advances in flow cytometric serology for canine visceral leishmaniasis: Diagnostic applications when distinct clinical forms, vaccination and other canine pathogens become a challenge. **Vet. Immunol. Immuno-pathol.**, v. 128, p. 79–86, 2009.
- BAIN, C.D., TROUGHTON, E.B., TAO, Y.T., EVALL, J., WHITESIDES, G.M., NUZZO, R.G. Formation of monolayer films by the spontaneous assembly of organic thiols from solution onto gold. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 111, p. 321–335, 1989.
- BARBOSA-DE-DEUS, R., MARES-GUIA, M.L., NUNES, A.Z., COSTA, K.M., JUNQUEIRA, R.G., MAYRINK, W., GENARO, O., TAVARES, C.A.P. Leishmania major-Like Antigen for Specific and Sensitive Serodiagnosis of Human and Canine Visceral Leishmaniasis. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 9, p. 1361–1366, 2002.
- BENSEBAA, F.; VOICU, R.; HURON, L.; ELLIS, T.H.; KRUUS, E. Kinetics of formation of long-chain n-alkanethiolate monolayers on polycrystalline gold. **Langmuir**, v. 13, p. 5335-5340, 1997.
- BERGNER, S., VATSYAYAN, P., MATYSIK, F. M. Recent advances in high resolution scanning electrochemical microscopy of living cells – A review. **Anal. Chim. Acta**, v. 775, p. 1–13, 2013.
- CABRAL-MIRANDA, G., JESUS, J.R., OLIVEIRA, P.R.S., BRITTO, G.S.G., PONTES-DE-CARVALHO, L.C., DUTRA, R.F., ALCÂNTARA-NEVES, N.M. Detection of Parasite Antigens In *Leishmania Infantum*–Infected Spleen Tissue By Monoclonal Antibody-, Piezoelectric-Based Immunosensors. **J. Parasitol.**, v. 100, p. 73–78, 2014.

CAMPUZANO, S., PEDRERO, M., MONTEMAYOR, C., FATAS, E., PINGARRON, J.M. Characterization of alkanethiol-self-assembled monolayers-modified gold electrodes by electrochemical impedance spectroscopy. **J. Electroanal. Chem**, v. 586, p. 112–121, 2006.

CANCINO, J., RAZZINO, C.A., SUCOLOTTO, V., MACHADO, S.A.S. The use of mixed self-assembled monolayers as a strategy to improve the efficiency of carbamate detection in environmental monitoring. **Electrochimica Acta**, v. 87, p. 717-723, 2013.

CARVALHAL, R.F. **Desenvolvimento de sensor biomimético empregando monocamadas auto-organizadas de tióis sobre eletrodos de ouro**. Dissertação (Mestre em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

CARVALHO, L.A., ANDRADE, A.R., BUENO, P.R. Espectroscopia de impedância eletroquímica aplicada ao estudo das reações heterogêneas em ânodos dimensionalmente estáveis. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 29, p. 796-804, 2006.

CARVALHO, R.M., RATH, S., KUBOTA, L.T., SPR - uma nova ferramenta para biossensores. **Quim. Nova**, v. 26, p. 97-104, 2003.

CHEN, Y., YANG, C., WANG, F. Electrochemical assessment of electrochemical oxidation stability of self-assembled monolayers on gold and preparation of binary self-assembled monolayers on gold. **Electrochimica Acta**, v. 55, p. 3951-3956, 2010.

CHIDSEY, C.E. D., LOIACONO, D.N. Chemical functionality in self-assembled monolayers: structural and electrochemical properties. **Langmuir**, v. 6, p. 682-691, 1990.

COELHO, D. **Caracterização eletroquímica de uma monocamada auto-organizada mista composta por ácido 3-mercaptopropiônico e ácido 11-mercaptoundecanóico**. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

COSTA, J.M. L., VIANA, G.M.C., SALDANHA, A.C.R., NASCIMENTO, M.D. S. B., ALVIM, A.C., BURATTINI, M.N., SILVA, A.R., Leishmaniose Visceral no Estado do Maranhão, Brasil. A evolução de Uma Epidemia. **Cad. Saúde Públ.**, Rio de Janeiro, v. 11, p. 321-324, 1995.

DAMOS, F.S., MENDES, R.K., KUBOTA, L.T. Aplicações de QCM, EIS e SPR na investigação de superfícies e interfaces para o desenvolvimento de (bio)sensores. **Química Nova**, v. 27, p. 970-979, 2004.

ECKERMANN, A.L., FELD, D.J., SHAW, J.A., MEADE, T.J. Electrochemistry of redox-active self-assembled monolayers. **Coord. Chem. Rev.**, v. 254, p. 1769–1802, 2010.

EDWARDS, M.A., MARTIN, S., WHITWORTH, A.L., MACPHERSON, J.V., UNWIN, P.R. Scanning electrochemical microscopy: principles and applications to biophysical systems. **Physiol. Meas.**, v. 27, R63–R108, 2006.

FARIA, A.R., COSTA, M.M., GIUSTA, M.S., GRIMALDI, G. JR., PENIDO, M.L.O., GAZZINELLI, R.T., ANDRADE, H.M. High-Throughput Analysis of Synthetic Peptides for

the Immunodiagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis. **PLoS Negl. Trop. Diseases**, v. 5, p. 1-9, 2011

FISCHER, J.A. **Estudo da formação de monocamadas auto-organizadas de tióis sobre Au (111)**. Dissertação (Mestrado em Física) – Programa de Pós-Graduação em Física, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

FONSECA, A.M., FARIA, A.R., RODRIGUES, F.T., NAGEM, R.A., MAGALHÃES, R.D., CUNHA, J.L., BARTHOLOMEU, D.C., ANDRADE, H.M. Evaluation of three recombinant *Leishmania infantum* antigens in human and canine visceral leishmaniasis diagnosis. **Acta Trop.**, v. 137, p. 25 – 30, 2014.

FREIRE, R.S., PESSOA, C.A., KUBOTA, L.T. Emprego de Monocamadas Auto-Organizadas no desenvolvimento de Sensores Eletroquímicos. **Química Nova**, vol. 26, p. 381-389, 2003.

GALLI, A. **Desenvolvimento e caracterização de um biosensor bienzimático imobilizado sobre monocamadas para determinação de açúcares em alimentos**. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

GARCIA-RAYA, D., MADUENO, R., SEVILLA, J.M., BLÁQUEZ, M., PINEDA, T. Electrochemical characterization of a 1,8-octanedithiol self-assembled monolayer (ODT-SAM) on a Au(111) single crystal electrode. **Electrochimica Acta**, v. 53, p. 8026-8033, 2008.

GOODING, J.J., MEARNNS, F., YANG, W., LIU, J. Self-assembled monolayers into the 21st: century recent advances and applications. **Electroanalysis**, v. 15, p. 81-93, 2003.

GRIESHABER, D., MACKENZIE, R., VÖRÖS, J., REIMHULT, E. Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. **Sensors**, v. 8, p. 1400-1458, 2008.

Guia de Vigilância em Saúde / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – Brasília: Ministério da Saúde, 2014. 812 p.

HERMANSON, G. T. **Bioconjugate Techniques**, 2nd edition, USA, Elsevier, (2008).

HOBARA, D., SASAKI, T., IMABAYASHI, S-I., KAKIUCHI, T. Surface structure of binary self-assembled monolayers formed by electrochemical selective replacement of adsorbed thiols. **Langmuir**, v. 5, p. 5073-5078, 1999.

HOMOLA, J. Surface Plasmon Resonance Sensors for Detection of Chemical and Biological Species. **Chem. Rev.**, v. 108, p. 462–493, 2008.

HOU, L., DING, Y., ZHANG, L., GUO, Y., LI, M., CHEN, Z., WU, X. An ultrasensitive competitive immunosensor for impedimetric detection of microcystin-LR via antibody-conjugated enzymatic biocatalytic precipitation. **Sens. Actuators, B**, v. 233, p. 63–70, 2016.

JESUS, J.R., CARVALHO, K.A., FONSECA, R.A.S., OLIVEIRA, G.G.S., MELO, S.M.B., NEVES, N.M.A., DUTRA, R.F. A piezoelectric immunosensor for *Leishmania chagasi* antibodies in canine serum. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 401, p. 917–925, 2011.

KAWAGUCHI, T., YASUDA, H., SHIMAZU, K. Electrochemical quartz Crystal Microbalance investigation of the reductive desorption of self-assembled monolayers of alkanethiols and mercaptoalcanoic acids on Au. **Langmuir**, v. 16, p. 9830-9840, 2000.

KAKIUCHI, T., SATO, K., ILDA, M., HORABA, D., IMABASHI, S.I. NIKI, K. Phase separation of alkanethiol self-assembled monolayers during the replacement of adsorbed thiolates on Au(111) with thiols in solution. **Langmuir**, v. 16, p. 7238-7244, 2000.

KRETSCHMANN, E. REATHER, H. Radiative decay of nonradiative surface plasmon excited by light. **Z. Naturf**, v. 23A, p. 2135-2136, 1968.

LAINSON, R., SHAW, J.J. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R, editors. The Leishmaniasis in Biology and Medicine. **London: Press Inc**; 1987. p. 12-120.

LEE, J. W., SIM, S.J., CHO, S.M., LEE, J. Characterization of a self-assembled monolayer of thiol on a gold surface and the fabrication of a biosensor chip based on surface plasmon resonance for detecting anti-GAD antibody. **Biosens. Bioelectron.**, v. 29, p. 1422-1427, 2005.

LUZ, J.G.G. **Desenvolvimento de um imunossensor para detecção de anticorpos anti-Trypanosoma cruzi por meio da espectroscopia de ressonância de plásmons de superfície**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2014.

Luz, J.G.G., Souto, D.E.P., Machado-Assis, G.F., Lana, M., Kubota, L.T., Luz, R.C.S., Damos, F.S., Martins, H.R. Development and evaluation of a SPR-based immunosensor for detection of anti-Trypanosoma cruzi antibodies in human serum. **Sensor. Actuat. B Chem.**, v. 212, p. 287-296, 2015.

MACDONALD, J.R. **Impedance Spectroscopy**. Wiley, New York, 1987.

MAYORGA-MARTINEZ, C.C., CHAMORRO-GARCÍA, A., SERRANO, L., RIVAS, L., QUESADA-GONZALEZ, D., ALTET, L., FRANCINO, O., SÁNCHEZ, A., MERKOCI, A. An iridium oxide nanoparticle and polythionine thin film based platform for sensitive Leishmania DNA detection. **J. Mater. Chem. B.**, v. 3, p. 5166–5171, 2015.

MEHROTRA, P. Biosensors and their applications - A review. **J. Oral Biol. Craniofac. Res.**, v. 6, p. 153-159, 2016.

MENDES, R.S., GURJÃO, T.A., OLIVEIRA, L.M., SANTANA, V.L., TAFURI, W.L., SANTOS, J.R.S., DANTAS, A.F.M., SOUZA, A.P. Miocardite crônica em um cão naturalmente infectado com Leishmania (Leishmania) infantum chagasi: aspectos clínicos e patológicos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.66, p.79-84, 2014.

MENDES, R.K. **investigação dos efeitos dos procedimentos de imobilização em monocamadas auto-organizadas da enzima peroxidase no desenvolvimento de um biosensor**. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

MOCCELINI, S.K., VIEIRA, I.C., LUCCA, B.G., BARBOSA, A.M.J., FERREIRA, V.S. Determination of thiodicarb using a biosensor based on alfalfa sprout peroxidase immobilized in self-assembled monolayers. **Talanta**, v. 82, p. 164-170, 2010.

MOSSANHA, R. **Preparação, caracterização e estudos eletroquímicos de eletrodos modificados com diferentes monocamadas auto-organizadas**. Dissertação (Mestrado em Química Aplicada) – Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2011.

MUNGE, B.S., COFFEY, A.L., DOUCETTE, J.M., SOMBA, B.K., MALHOTRA, R., PATEL, V., GUTKIND, J.S., RUSLING, J.F. Nanostructured Immunosensor for Attomolar Detection of Cancer Biomarker Interleukin-8 Using Massively Labeled Superparamagnetic Particles **Angew. Chem. Int. Ed.**, v. 123, p. 8061–8064, 2011.

NAGY, G., NAGY, L., Scanning Electrochemical Microscopy: A New Way of Making Electrochemical Experiments. **Fresenius J. Anal. Chem.**, v. 366, p. 735-744, 2000.

O'DWYER, C., GAY, G., VIARIS-DE-LESEGNO, B., WEINER, J. The nature of alkanethiol self-assembled monolayer adsorption on sputtered gold substrates. **Langmuir**, v. 20, pp 8172–8182, 2004.

OLIVEIRA, C.P. **Desenvolvimento de uma camada de reconhecimento biológico de ligação universal para utilização em imunoenaios**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Instituto Superior Técnico Lisboa, Portugal, 2013.

OTTO, A. Excitation of nonradiative surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection. **Zeitschrift für Physik**, v. 216, p. 398-410, 1968.

PHONG, P.H., TOMONO, H., NISHI, N., YAMAMOTO, M., KAKIUCHI, T. Artificially phase-separated binary self-assembled monolayers composed of 11-amino-1-undecanethiolate and 10-carboxy-1-decanethiolate on Au(111): A comparative study of two preparing methods. **Electrochimica Acta**, v. 53, p. 4900-4906, 2008.

PHONG, P.H., SOKOLOV, V.V., NISHI, N., YAMAMOTO, M., KAKIUCHI, T. Concentration-dependent switching of the mode of phase separation in ternary self-assembled monolayers of 2-mercaptoethane sulfonic acid, 2-aminoethanethiol and 1-dodecanethiol on Au(111). **J. Electroanal. Chem.**, v. 600, p. 35-44, 2007.

POIRIER, G. E., PYLANT, E. D. The self-assembly mechanism of alkanethiols on Au(111). **Science**, v. 272, p. 1145-1148, 1996.

RAMOS-JESUS, J., CARVALHO, K.A., FONSECA, R.A.S., OLIVEIRA, G.G.S., MELO, S.M.B., ALCÂNTARA-NEVES, N.M., DUTRA, R.F. A piezoelectric immunosensor for Leishmania chagasi antibodies in canine serum. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 401, p. 917–925, 2011.

RAMOS-JESUS, J., PONTES-DE-CARVALHO, L.C., MELO, S.M.B., ALCÂNTARA-NEVES, N.M., DUTRA, R.F. A gold nanoparticle piezoelectric immunosensor using a

recombinant antigen for detecting *Leishmania infantum* antibodies in canine serum. **Biochem. Eng. J.**, v. 110, p. 43-50, 2016.

RICCARDI, C.S., COSTA, P.I.; YAMANAKA, H. Imunossensor amperométrico. **Química Nova**, v. 25, p. 316-320, 2002.

RODUNER, E. Size matters: why nanomaterials are diferente. **Chem. Soc. Rev.**, v. 35, p. 583-592, 2006.

ROYCHOUDHURY, R., MARTINEZ, P.A., GRINNAGE-PULLEY, T., SCHAUT, R.G., PETERSEN, C.A. Acid-Triggered Degradable Reagents for Differentiation of Adaptive and Innate Immune Responses to *Leishmania*-Associated Sugars. **Angew. Chem. Int. Ed.**, v. 54, p. 9610–9613, 2015.

SABATINI, E., RUBINSTEIN, I., MOAZ, R., SAGIV, J. Organized self-assembling monolayers on electrodes, **J. Electroanal. Chem.**, v. 219, p. 365-371, 1987.

SHAI DAROVA, L.G., BUDNIKOV, G.K. Chemically modified electrodes based on noble metals, polymer films, or their composites in organic voltammetry. **J. Anal. Chem.**, v. 63, p. 922-942, 2008.

SHIMAZU, K., KAWAGUCHI, T., ISOMURA, T. Construction of mixed mercaptopropionic acid/alkanethiol monolayers of controlled composition by structural control of a gold substrate with underpotentially deposited lead atoms. **J. American Chem. Soc.**, v. 124, p. 652-661, 2002.

SILVA, L.M.C. **Desenvolvimento de biossensores eletroquímicos para fenol e uréia com foco na aplicação ambiental**. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

SILVA, S.M., OLIVEIRA, F.M, JUSTINO, D.D., KUBOTA, L.T., TANAKA, A.A., DAMOS, F.S., LUZ, R.C.S. A Novel Sensor Based on Manganese azo-Macrocyclic/Carbon Nanotubes to Perform the Oxidation and Reduction Processes of Two Diphenol Isomers. **Electroanalysis**, v. 26, p. 602 – 611, 2014.

SILVEIRA, F. T., CORBETT, C. E. P. *Leishmania chagasi* Cunha & Chagas, 1937: nativa ou introduzida? Uma breve revisão. **Rev. Pan-Amaz. Saude**, v. 1, p.143-147, 2010.

SMITH, R.K., REED, S.M., LEWIS, P.A., MONNELL, J.D., CLEGG, R.S., KELLY, K.F., BUMM, L.A., HUTCHISON, J.E., WEISS, P.S. Phase Separation within a Binary Self-Assembled Monolayer on Au{111} Driven by an Amide-Containing Alkanethiol. **J. Phys. Chem. B**, v. 105, p. 1119–1122, 2001.

SOUTO, D.E.P, SILVA, J.V., MARTINS, H.R, REIS, A.B, LUZ, R.C.S., KUBOTA, L.T. DAMOS, F.S. Development of a label-free immunosensor based on surface plasmon resonance technique for the detection of anti-*Leishmania infantum* antibodies in canine serum. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 46, p. 22–29, 2013.

SOUTO, D.E.P., FARIA, A.R., ANDRADE, H.M., KUBOTA, L.T. Using QCM and SPR for the Kinetic Evaluation of the Binding Between A New Recombinant Chimeric Protein and Specific Antibodies of the Visceral Leishmaniasis. **Current. Protein. Pept. Sci.**, v. 16, p. 782-790, 2015a.

SOUTO, D.E.P., FONSECA, A., BARRAGAN, J.T.C., LUZ, R.C.S., ANDRADE, H.M., DAMOS, F.S., KUBOTA, L.T. SPR analysis of the interaction between recombinant protein of unknown function in *Leishmania infantum* immobilised dendrimers and antibodies of the visceral leishmaniasis: A potential use in immunodiagnosis. **Biosens. Bioelectron.**, v. 70, p. 275–281, 2015b.

SOUTO, D.E.P., SILVA, J.V., MARTINS, H.R., REIS, A.B., LUZ, R.C.S., KUBOTA, L.T., DAMOS, F.S. Development of a label-free immunosensor based on surface plasmon resonance technique for the detection of anti-*Leishmania infantum* antibodies in canine serum. **Biosens. Bioelectron.** v. 46, p. 22–29, 2013.

SOUTO, D.E.P. **Desenvolvimento de um imunossensor pela técnica de ressonância de plásmons de superfície para detecção em tempo real de anticorpos anti-*Leishmania Infantum***. Dissertação (Mestrado em Química) - Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2012.

SRIVASTAVA, P., DAYAMA, A., MEHROTRA, S., SUNDAR, S. Diagnóstico de leishmaniose visceral. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 105, p. 16, 2011.

THÉVENOT, D.R., TOTH, K., DURST, R.A., WILSON, G.S. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classifications. **Biosens. Bioelectron.**, v. 16, p. 121-131, 2001.

UMEDA, K., FUKUI, K. Observation of redox-state-dependent reversible local structural change of ferrocenyl-terminated molecular island by electrochemical frequency modulation AFM. **Langmuir**, v. 26, p. 9104–9111, 2010.

VERICAT, C., VELA, M.E., BENITEZ, G., CARRO, P., SALVAREZZA, R.C. Self-assembled monolayers of thiols and dithiols on gold: new challenges for a well-known system. **Chem. Soc. Rev.**, v. 39, p. 1805-1834, 2010.

World Health Organization (WHO), **Geneva**, v. 91, 285-296, 2016.

World Health Organization (WHO), **Process of validation of elimination of kala-azar as a public health problem in South-East Asia**, General, India 2016

World Health Organization (WHO), Technical Report Series 949, p.1–186, 2010.