ÁREA DE SUBMISSÃO: BIOTECNOLOGIA E NANOTECNOLOGIA EM SAÚDE -
BNS11

NOVA ESTRATÉGIA DE BIODETECÇÃO DE LEISHMANIOSE BASEADA EM FILME NANOESTRUTURADO DE POLIANILINA

M.F.K.S. GARCIA^{1,3}, F. L. de Melo², C. A. S. ANDRADE³ e M.D.L. OLIVEIRA³

¹ Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, Centro de Biociências, UFPE.

² Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Departamento de Parasitologia.

³ Laboratório de Biodispositivos Nanoestruturados, Departamento de Bioquímica, UFPE.

E-mail para contato: flaviaksg@hotmail.com

RESUMO – *A leishmaniose é uma zoonose largamente disseminada no Brasil. O presente trabalho tem como principal objetivo estudar o processo de eletropolimerização do sistema NPsFe₃O₄/ Quit/PANI frente amostras de genoma e soro de cães infectados com leishmaniose. A avaliação do sistema foi realizada através da técnica eletroquímica de voltametria cíclica para caracterizar as propriedades elétricas do sistema NPsFe₃O₄/ Quit/PANI-Primer_{Leish}. Os resultados mostram que o sistema sensor foi capaz de reconhecer as amostras de genomas e de soro dos cães infectados, em várias concentrações, sendo observada uma diminuição da resposta amperométrica total do sistema. Mostrando assim que o sistema NPsFe₃O₄/ Quit/PANI-Primer_{Leish} é viável para detecção da leishmaniose.*

Palavras chave- biossensor, voltametria, impedância, leishmaniose

ABSTRACT- *Leishmaniasis is a widespread zoonosis in Brazil. The present work has as main objective to study the process of electropolymerization of the NPsFe₃O₄ / Quit / PANI system against genome and serum samples from dogs infected with leishmaniasis. The evaluation of the system was performed by the electrochemical technique of cyclic voltammetry to characterize the electrical properties of the NPsFe₃O₄ / Quit / PANI-Primer_{Leish} system. The results show that the sensor system was able to recognize the genomic and serum samples of the infected dogs at various concentrations, with a decrease in the total amperometric response of the system. Thus showing that the NPsFe₃O₄ / Quit / PANI-Primer_{Leish} system is feasible for detection of leishmaniasis.*

Keywords- biosensor, voltammety, impedance, leishmaniasis

1. INTRODUÇÃO

A *Leishmania* é um gênero de protozoários da família Trypanosomatidae, que inclui os parasitas causadores das leishmanioses. A leishmaniose visceral (LV) é transmitida ao homem por insetos vetores ou transmissores, conhecidos como flebotomíneos (Souto et al, 2013). A transmissão acontece quando uma fêmea infectada

passa o protozoário a uma vítima sem a infecção, enquanto se alimenta de seu sangue (Diniz et al, 2010). É causada por espécies do gênero *Leishmania*, pertencentes ao complexo *donovani*. São reconhecidas três espécies como agentes etiológicos da doença destacando-se a *Leishmania infantum* (Souto et al, 2013). É uma zoonose largamente disseminada, que representa um problema sério de saúde pública com várias manifestações clínicas que dependem da espécie. Além disso, a leishmaniose destaca-se como a segunda causa de mortalidade dentre doenças negligenciadas (Reis et al, 2009). O número de cães infectados constitui um problema na transmissão da infecção para humanos. Aspectos clínicos para o diagnóstico são de extrema importância devido à presença de sinais e sintomas inespecíficos em oligossintomáticos (Gontijo et al, 2004).

Os exames parasitológicos são considerados métodos de referência no diagnóstico da LV, ainda que requeiram procedimentos invasivos e a necessidade de profissionais experientes. São ainda procedimentos que demandam trabalho intensivo e que não apresenta sensibilidade ideal. A confirmação de LV pode ser feita pela demonstração direta em esfregaços ou pelo cultivo do parasito obtido de baço, fígado, medula óssea ou linfonodos (Reis et al, 2009). A especificidade dos métodos parasitológicos é de cerca de 100%, mas a sensibilidade é bastante variável, pois a distribuição dos parasitas não é homogênea no tecido e varia de 95 a 98% quando se utiliza o aspirado de baço, de 76 a 91% para o de fígado, de 52 a 89% para o de medula óssea e 52 a 69% para o de linfonodos (Gontijo et al, 2004).

Além disso, vários testes como o ELISA, imunofluorescência e ensaios imunocromatográficos destinam-se para o diagnóstico da LV (Gontijo et al, 2004).

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

Biossensores são pequenos dispositivos que utilizam componentes biológicos como elementos de reconhecimento de outros representantes biológicos, como vírus, bactérias, fungos ou mesmo células cancerígenas. Para construção de biossensores eletroquímicos, é de extrema importância imobilizar os elementos de reconhecimento sobre o eletrodo para fornecer os sítios de reconhecimento molecular, associado a isso vem sendo utilizados nanomateriais para facilitar a detecção do analito de interesse com sensibilidade (Mugasa et al, 2010).

Os biossensores eletroquímicos de DNA baseados na hibridização de ácido nucléico tem recebido uma considerável atenção devido a sua potencial aplicação para o diagnóstico de várias doenças (Mohan et al, 2011).

O presente trabalho refere-se a construção de uma plataforma, baseada na aplicação de uma sequência curta de oligonucleotídeos (sonda de DNA) ligados eletrostaticamente a superfície de nanopartículas de magnetita (NpsFe_3O_4), quitosana, polianilina para o diagnóstico da Leishmaniose.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O eletrodo de ouro será polido com alumina 0,5 μm e sonificado por 1 minuto em água deionizada, e posteriormente seco com nitrogênio (N_2). Em seguida, o eletrodo de ouro será submetido a um potencial de -0,2 V para torná-lo catódico por 2 min. Os experimentos de voltametria cíclica (VC) serão realizados em um Potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT128N numa célula convencional de três

eletrodos. O eletrodo de trabalho (ET) utilizados será de ouro modificado com o primer, o eletrodo de ouro como contra eletrodo e o de referência será o Ag/AgCl saturado com KCl. As medidas de VC serão realizadas na mesma solução de ferro-ferricianeto de potássio com potenciais de -0,2 a 0,7V e velocidade de varredura de 50 mV. Para montar o nanocompósito juntou-se 0,001ng de nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4) e 1 mL de quitosana colocadas sob sonicação por 30min, em seguida adicionado 10mL de HCL (0,5M) e 180 μL de anilina. O procedimento seguido para preparar o biossensor foi o seguinte: O eletrodo foi polido com uma lixa com água deionizada, seguido por imersão em solução de hipoclorito de sódio durante aproximadamente 10 minutos e secou-se à temperatura ambiente. Após lavagem com água deionizada o eletrodo foi imediatamente imerso na solução de eletrodeposição magnetita/ quitosana/ polianilina (10mL) onde foram realizados 30 ciclos, a fim de obter o filme de magnetita/ quitosana/ polianilina. Seguida a lavagem foi adicionado o Primer e incubado durante 30 minutos para se obter o sistema $\text{NpsFe}_3\text{O}_4/\text{Quit}/\text{PANI-Primer}$, posteriormente a incubação do genoma foi realizada por um período de tempo 30 minutos e, finalmente, a amostra com o DNA-alvo pelo mesmo período. A lavagem foi executada com água deionizada após cada incubação.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A voltametria cíclica constitui uma técnica eficaz e versátil no estudo de mecanismos reacionais e análise no desenvolvimento de biossensores permitindo o estudo comparativo de materiais adsorvidos sobre o eletrodo.

A Figura 1 mostra os voltamogramas cíclicos do processo de montagem do biossensor, onde podemos observar no voltamograma em preto as correntes de picos anódicos (I_{pa}) e catódicos (I_{pc}) bem definidos, o que é característico de um processo limitado por difusão. Com a adição de $\text{NPsFe}_3\text{O}_4/\text{Quit}/\text{PANI}$ vemos a diminuição acentuada destes picos, caracterizando assim a aderência do nanocompósito à superfície do eletrodo (voltamograma vermelho). Após a adição do primer de leishmaniose ($\text{Primer}_{\text{Leish}}$) observa-se uma nova redução dos I_{pa} e I_{pc} (azul), onde esta diminuição dos picos reflete a interação eletrostática entre o nanocompósito e o primer, comprovando assim a ligação e formação da camada sensora $\text{NPsFe}_3\text{O}_4/\text{Quit}/\text{PANI-Primer}_{\text{Leish}}$.

Figura 1- apresenta a voltametria cíclica das etapas de montagem do biossenso

A Figura 2 mostra os voltamogramas cíclicos do sistema sensor referentes as análises com o genoma 0,5ng e suas respectivas diluições (1:500/1:100/1:50), mostrando assim que houve hibridação e reconhecimento da sequência complementar. No voltamograma cíclico é possível observar que após cada etapa de modificação do eletrodo de ouro, há uma queda da resposta amperométrica do sistema, como também observa-se que quanto maior a concentração do genoma, menor são as correntes de pico anódicas e catódicas.

Figura 2- apresenta a voltametria cíclica após a montagem do sistema $\text{NPsFe}_3\text{O}_4/\text{Quit/PANI-Primer}_{\text{Leish}}$ -Genoma.

A Figura 3 mostra os voltamogramas cíclicos do processo de bioreconhecimento do biossensor frente as amostras clínicas de cães infectados (DNA). No voltamograma cíclico podemos observar que foram analisadas uma amostra concentrada (10ng) e a mesma diluída em várias concentrações (1ng/0,1ng/0,01ng/0,001ng/ 0,0001ng), mostrando assim a viabilidade e sensibilidade de utilização do sistema sensor, onde avaliando cada resposta do voltamograma cíclico, pode-se observar que quanto mais concentrada a amostra, menores são as correntes de pico anódicas e catódicas, mostrando que quando aplicado o potencial sobre o eletrodo de trabalho, há um maior impedimento de passagem da corrente de elétrons.

Figura 3- apresenta a voltametria cíclica do sistema sensor frente as amostras clínicas de cães infectados.

4. CONCLUSÃO

Através dos resultados que foram obtidos pode-se concluir que o sistema $\text{NPsFe}_3\text{O}_4/\text{Quit/PANI-Primer}_{\text{Leish}}$ é uma alternativa viável para a biodetecção de leishmaniose.

5. REFERÊNCIAS

- VILELA, M.; MENDONÇA, S.; Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz), 2013.
- REIS, A.B., MARTINS-FILHO, O.A., TEIXEIRA-CARVALHO, CARVALHO, M. G., MAYRINK, W., FRANÇA-SILVA, J.C., GIUNCHETTI, R.C., GENARO, O., CORREA-OLIVEIRA, R. Res. Vet. Sci. 81, 68, 2006.
- ALVES, W. A., BEVILACQUA, P. D. Cadernos de Saúde Pública 20, 259, 2004.
- TEIXEIRA-NETO, R.G., GIUNCHETTI, R.C., CARNEIRO, C.M., VITOR, R.W., COURA-VITAL, W., QUARESMA, P.F., KER, H.G., DE MELO, L.A., GONTIJO, C.M., REIS, A.B. Vet. Paras., 11, 248, 2012.
- YU, YY., CHANG, S.S., LEE, C.L., WANG, C.R.C. J. Phys. Chem. B, 101, 6661, 1997.
- C.A.S., SANTOS, C.G., DE MELO, C.P. Compósitos de nanopartículas fluorescentes em sí, processo para preparação dos mesmos e uso em sistemas de diagnóstico rápido com afinidade a moléculas biológicas. Nº 00184.2008.
- NASCIMENTO, H.P.O., OLIVEIRA, M.D.L., DE MELO, C.P., SILVA, G.J.L., CORDEIRO, M.T., ANDRADE, C.A.S. Coll. Surf. B, Biointerfaces, 86, 414, 2011.
- OLIVEIRA, M.D.L. CORREIA, M.T.S., DINIZ, F.B. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2008, 66, 13.
- MARZOCHI, M. C. A.; COUTINHO, S. G.; SOUZA, W. J.; AMENDOEIRA, M.R. Leishmaniose Visceral (Calazar). Jornal Brasileiro de Medicina, v. 41, n. 5, p. 61-84, 1981.
- MICHALICK, M. S. M.; GENARO, O., NEVES, D. P.; MELO, A. L.; LINARDI, P. M.; VITOR, R. W. A. Leishmaniose visceral americana. Parasitologia Médica. Atheneu, São Paulo, c. 10, v. 1, p. 67-83, 2005.
- LAINSON, R; SHAW, J. J.; SILVEIRA, F. T.; BRAGA, R. R.; RYAN, L; POVOA, M. M.; et al. A Leishmania e as Leishmanioses. In: Lainson R, organizador. Instituto Evandro Chagas: 50 anos de contribuição às ciências biológicas e à medicina tropical. Serviços de saúde pública. Belém: Instituto Evandro Chagas. v. 1, p. 83-124, 1986.
- GENARO, O. Leishmaniose visceral americana. In: NEVES, D. P.; MELO, A. L.; LINARDI, P. M. Parasitologia Humana. Atheneu, São Paulo, c. 10, p. 56-72, 2000.

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

CAMPOS R.M. Caracterização molecular de antígenos de *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* potencialmente úteis no controle da leishmaniose visceral. 2007. 114 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Fundação Oswaldo Cruz- Centro de Pesquisas AGGEU MAGALHÃES, Recife, 2007

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

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

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

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

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

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

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

MOHAN, S., SRIVASTAVA, P., MAHESHWARI, S.N., SUNDAR, S., PRAKASH, R. Nano-structured nickel oxide based DNA biosensor for detection of visceral leishmaniasis (Kala-azar), *Analyst* 136 (2011) 2845-2851.

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

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

6. AGRADECIMENTOS

FACEPE, UFPE.