



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

Beatriz Rodrigues Martins

**DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSSENSOR PARA DETECÇÃO ESPECÍFICA DE
LEISHMANIOSES EM ELETRODO DE GRAFITE COM OURO
ELETRODEPOSITADO**

Uberaba

2019

Beatriz Rodrigues Martins

**DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSSENSOR PARA DETECÇÃO ESPECÍFICA DE
LEISHMANIOSES EM ELETRODO DE GRAFITE COM OURO
ELETRODEPOSITADO**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Fisiológicas, área de concentração I:
Bioquímica, Fisiologia e Farmacologia, da
Universidade Federal do Triângulo
Mineiro, como requisito parcial para
obtenção do título de mestre em Ciências
Fisiológicas.

Orientadora: Renata Pereira Alves Balvedi

Uberaba

2019

**Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do
Triângulo Mineiro**

M341d Martins, Beatriz Rodrigues
Desenvolvimento de imunossensor para detecção específica de
leishmanioses em eletrodo de grafite com ouro eletrodepositado /
Beatriz Rodrigues Martins. -- 2019.
57 p. : il., fig., graf., tab.

Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) --
Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2019
Orientadora: Profa. Dra. Renata Pereira Alves Balvedi

1. Doença de chagas. 2. Leishmaniose. 3. Técnicas biossenso-
riais. 4. Eletroquímica. 5. Eletrodos. I. Balvedi, Renata Pereira Alves.
II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 616.937

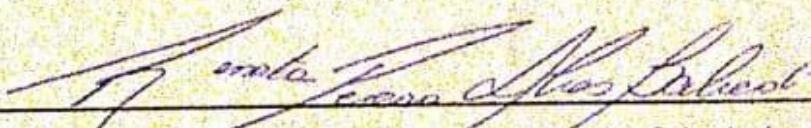
BEATRIZ RODRIGUES MARTINS

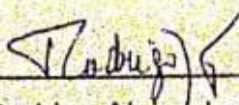
**TÍTULO: IMUNOSSENSOR PARA DETECÇÃO ESPECÍFICA DE
LEISHMANIOSES EM ELETRODO DE GRAFITE COM OURO
ELETRODEPOSITADO**

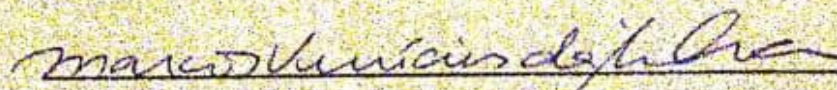
Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Fisiológicas, área de concentração I:
Bioquímica, Fisiologia e Farmacologia, da
Universidade Federal do Triângulo
Mineiro, como requisito parcial para
obtenção do título de mestre(a) em
Ciências Fisiológicas.

Aprovado em: 22 de MAIO de 2019.

BANCA EXAMINADORA


Prof.^a Dr.^a Renata Pereira Alves Balvedi – Orientadora
Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM)


Prof. Dr. Rodrigo Alejandro Abarza Munoz
Universidade Federal de Uberlândia (UFU)


Prof. Dr. Marcos Vinícius da Silva
Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM)

DEDICATÓRIA

Eu não poderia a descrever o que me motivou e me trouxe até aqui, sem antes falar de meus pilares de sustentação. Meus pais sempre foram e são, a força que me apoiam, com sensatez, quando acredito que já não sei os caminhos a serem seguidos. Sou filha de uma Diretora de Escola Municipal de Uberlândia, apaixonada pelo que faz e possuidora de um senso crítico-estético de tudo o que faz. Meu pai que apesar de não possuir uma formação superior, é um admirador nato e uma pessoa batalhadora, representando as raízes firmes no chão que a família precisa. Além disso, não posso deixar de citar minha irmã, uma pessoa de temperamentos tão intensos que deixaria a maioria das pessoas loucas, mas uma pessoa iluminada e certa de suas decisões.

Vejo que meus pais se completam! Um é a paixão e a visão poética da vida, o outro, a forma fixa e prática de lidar com as questões do cotidiano. Minha irmã é a intensidade e o 8 ou 80 que precisamos. E eu crescendo nesse ambiente familiar sempre me vi como o ponto de equilíbrio entre meus pilares, vejo que tenho a admiração pela vida de forma arquitetada e prática, tomo decisões intensas rápidas que são anteriormente pensadas.

Durante meus anos de faculdade, “perambulei” por diversas áreas da pesquisa, inclusive alguns laboratórios de Fisiologia e Bioquímica, mas não conseguia me encontrar em meio aos experimentos. Depois de alguns semestres (quase finais) conheci a minha atual orientadora, a Professora Dra. Renata Pereira Alves Balvedi. No primeiro momento eu não entendia muito bem o que ela falava, na verdade eu nem sabia se eu queria entender.

Depois de muito insistir comecei a entrar na “onda” e pouco a pouco comecei a ver o lado belo dos sensores e acreditar no propósito que a Professora Renata apresentava. Ufa! Finalmente percebi que o meu equilíbrio havia sido reestabelecido. Eu não sabia dizer exatamente, em que momento e nem a ação principal. Após fazer um “check up” interno da minha vida, eu estava apaixonada pelo que fazia e pelas perspectivas que minha pesquisa poderia gerar na vida das pessoas. Mal sabia eu o que me esperava!

Acredito que orientando é reflexo de orientador! Somos reflexo dos nossos pais, orientadores, escolhas de vida, lutas que decidimos travar e vencer! Tenho exemplos que lutam e trabalham muito pelos propósitos que acreditam, minha família e minha orientadora são espelhos nesse aspecto.

O grupo de pesquisa coordenado pela professora Renata, possui uma característica comum que nos une, somos resilientes. Somos todas teimosas demais e temos propósitos de vidas em comum: a pesquisa e a busca por fazer algo que mude a vida de pessoas. Produzimos muito no decorrer do meu período de mestrado, isso vem principalmente dos apoios de nossas famílias, mas também do fato de sabermos o que queremos pras nossas vidas. Afinal, fazer um mestrado sem bolsa e em outra cidade, só é possível com financiamento familiar e pensamento firme em algum propósito.

Conscientemente, sabemos que pesquisa não é brinquedo e não é somente para obter mais um título (inevitavelmente quando se trabalha, os títulos vêm). Para nós, pesquisa é entender o seu potencial, assumir uma postura de mudar o mundo e melhorar a vida de quem está no corredor de um hospital público, quase sem recurso.

De fato, o ambiente das pesquisas, não é um local fácil de lidar, confesso! Por vezes, me senti ansiosa e com raiva de resultados que eu tinha certeza que dariam certo e deram errado. Em momentos que preciso relembrar do porque estudo, vou ao Pronto Socorro, respirar e me inspirar.

Mais do que muitos, eu sei o que é vivenciar o que esses pacientes vivenciam por dias, meses ou anos. Sei o que é conhecer todas as sensações possíveis em um só momento, sei o que é ver sua família sofrendo junto com você em uma agonia... Só quem passa saberia explicar e definir. Meu acidente no início de 2019 me fez reafirmar minhas escolhas e decidir com certeza sobre minhas metas, esse momento importante de minha trajetória, percebi que meus propósitos foram reafirmados.

Enfim, dedico minha dissertação a todos que me fizeram ser quem sou, que acreditaram em meu potencial e que de alguma forma me deram força para seguir os

meus sonhos. Dedico ainda a cada trabalhador, que por vezes sem instrução ou sem saber, financiam em algum momento as pesquisas brasileiras. E em especial, dedico minha pesquisa aos meus pais, irmã, namorado e orientadora. E afirmo, com toda certeza, que cada pessoa importante, cada momento e cada palavra, mesmo que não citados, tomaram conta de mim quando decidi escrever a minha dedicatória.

AGRADECIMENTOS

Em um primeiro momento agradeço a Deus por me dar a oportunidade de fazer pesquisa, pela família que tenho, por meus amigos e pessoas iluminadas que traçaram meu caminho e especialmente por minha vida e, consequente saúde física e mental.

Agradeço aos meus pais, Osvaldo Vicente Martins e Eva Rodrigues Ribeiro Martins, por lutarem pelo meu futuro e me guiarem. Por proporcionar a oportunidade de traçar os caminhos que escolhi para seguir. Agradeço ainda por serem meu apoio e minha fortaleza nos momentos em que pensei em voltar para Uberlândia.

A minha irmã e fiel escudeira, Laura Rodrigues Martins, por toda dedicação, apoio e atitude que tomou e toma pelo meu bem. Menina forte, dedicada aos estudos e a família, guerreira e companheira. Seu apoio e exemplo são inspirações para os meus dias difíceis de laboratório.

Ao meu namorado Guilherme Felipe Simão, que apesar do pouco tempo de convivência, é uma pessoa carinhosa, dedicada, leal, companheira. Sua inteligência, dedicação às pessoas que ama e a irritante mania de não ser flexível com suas metas é uma inspiração para mim.

A todos os meus amigos e colegas, que de alguma forma me apoiaram e deram força. Por tornarem essa trajetória mais leve e alegre, facilitando em alguns pontos a ausência física da minha família.

As alunas e companheiras da UFTM, Ana Karoline Silva Rocha de Farias, Cristhianne Molinero Andrade Ratkevicius, Loren Queli Pereira, Tainá Marques Sampaio e Yanne Oliveira Barbosa, pela dedicação e apoio nos momentos em que precisei de ajuda durante a execução de etapas fundamentais na construção do trabalho.

Aos professores, Anielle Christine Almeida Silva, Carlo José Freire de Oliveira, Marcos Vinícius da Silva, Robson Tadeu Soares de Oliveira Junior, Rodrigo Alejandro Abarza Muñoz e Virmondes Rodrigues Júnior, que nos apoiaram no decorrer da pesquisa, abrindo as portas dos laboratórios e fornecendo equipamentos, instrumentos e conhecimentos essenciais para a construção desse trabalho.

A minha orientadora, Prof. Dra. Renata Pereira Alves Balvedi, por me apresentar essa metodologia, confiar parte de sua linha de pesquisa a mim e dar todo o apoio necessário para que essa etapa da minha jornada fosse concretizada. Por ser um exemplo de pessoa compromissada, competente e extremamente dedicada aos seus orientandos.

À UFTM, PROPPG, PPGCF, PPGMEDTROP, aos órgãos de fomento as pesquisas. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa. E, o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - pela concessão de bolsas aos demais pesquisadores envolvidos. À CNPq, por apoiar e financiar as pesquisas brasileiras. E assim, propiciarem o crescimento do país e o avanço nas pesquisas.

“Educação não transforma o mundo. Educação muda as pessoas. Pessoas transformam o mundo.”

Paulo Freire

RESUMO

O trabalho descreve uma metodologia para diagnóstico eletroquímico de Leishmanioses (LSH), que suprime a reação cruzada com a Doença de Chagas (DC). Estudos anteriores demonstram que as reações cruzadas ocorrem nos testes disponíveis no mercado (ELISA). Esta problemática não permite início correto e/ou precoce do tratamento desta enfermidade. Os imunossensores eletroquímicos são dispositivos com características notáveis na obtenção de diagnósticos, com excelente custo benefício e rápida execução. A Leishmaniose foi selecionada, levando-se em consideração seu enorme impacto na saúde pública e na dificuldade em se obter um diagnóstico preciso e diferencial, uma vez que, mediante o exposto, desenvolveu-se um sensor eletroquímico para diagnóstico específico e seletivo para as Leishmanioses. As informações sobre sensibilidade de biossensores eletroquímicos permitiu testar as biomoléculas anteriormente em testes de ELISA, adaptando com metodologias apropriadas para os sensores. As características de três plataformas diagnósticas foram estudadas e comparativamente testadas. Assim, eletrodos screen-printed de ouro, grafite e eletrodos screen-printed de grafite eletrodepositado com ouro foram selecionados como plataformas para imobilização de antígenos totais brutos. Os anticorpos foram detectados em soros de pacientes: pools de doenças de Chagas e Leishmanioses para realização dos testes iniciais. As propriedades eletroquímicas, avaliadas por voltametria cíclica ($0,1 \text{ V.s}^{-1}$). O par redox Ferri/Ferrocianeto de Potássio, possibilitaram a análise dos picos de corrente anódicas e catódicas. Os resultados, obtidos pelo potenciostato EmStat1/software PSTrace8, demonstram a melhor eficiência do eletrodo de grafite com filme de ouro eletrodepositado, em relação às demais plataformas testadas. O diagnóstico obtido, não somente permitiram a discriminação das doenças de Chagas e Leishmanioses na forma de pool, como também suas formas isoladas. Ressaltamos que as análises comparativas com ELISA indiretas foram realizadas com os mesmos grupos, apresentaram reações cruzadas. Quanto à estabilidade, obtivemos resultados satisfatórios em 5 dias de análises e curva de calibração com LOD em 9,466. Portanto, este sensor pode ser apresentado como um dispositivo eficiente na utilização como método diagnóstico eficiente e eficaz dos anticorpos de Leishmanioses, presentes no soro de pacientes.

Palavra-chaves: Imunossensor. Eletroquímica. Leishmanioses. Doença de Chagas. Filme de ouro. Eletrodo de grafite.

ABSTRACT

The work is a methodology for the electrochemical diagnosis of Leishmaniasis (LSH), which is supreme to a cross reaction with Chagas disease (DC). Previous studies have demonstrated that cross-reactions occur in commercially available testis (ELISA). This problematic is to top early and / or delay of the treatment of nurse. Electrochemical immunosensors are devices with remarkable parameters in the search for diagnoses, with an excellent cost-benefit and fast execution. Leishmaniasis was selected, leading to serious difficulties in public health and the need for early and differential diagnosis. Through the above, an electrochemical sensor was developed for the specific and selective diagnosis for Leishmaniasis. Information on the resistance of electrochemical biosensors can be tested as biomolecules in ELISA testicles, adapting to social methodologies for sensors. The diagnostic characteristics were studied and comparatively tested. Thus, screen-printed electrodes of gold, graphite and electrodeposited graphite screen-printed electrodes with gold selected as the basis for immobilization of crude total antigens. Antibodies were detected in patient sera: Chagas disease and Leishmaniasis pools for the initial tests. As electrochemical properties evaluated by cyclic voltammetry (0.1 Vs^{-1}). The solutions of $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ $3\text{H}_2\text{O}$ and KCl allow an analysis of anode and cathodic current potentials. The results obtained are demonstrated by the performance test of a PSTrace8 model, showing a better performance of graphite with gold electrodeposited film in relation to the others tested. The diagnosis obtained not only allowed the separation of Chagas and Leishmaniosis diseases in the form of swimming pool, but also their isolated forms. We emphasize that the comparative analyzes with indirect ELISA, we performed with our groups, the last cross reactions. Regarding stability, the performance is satisfactory in 5 days of analysis and the calibration curve with the RSD in 9.466. Therefore, this sensor can be presented as an effective device in the way the diagnosis is effective and effective of the antibodies of Leishmaniasis, present in patients.

Key words: Immunosensor. Electrochemistry. Leishmaniasis. Chagas disease. Gold film. Graphite electrode.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Pág.
Figura 1 – Representação de regiões endêmicas de <i>Leishmania spp.</i> no Brasil.....	17
Figura 2 – Avaliação de número de casos de <i>Leishmania spp.</i> nos estados brasileiros.....	17
Figura 3 – Representação esquemática do ciclo de infecção antroponótico natural de casos de <i>Leishmania spp.</i>	19
Figura 4 – Representação esquemática do ciclo de infecção zoonótico, antroponótico natural e artificial de casos de <i>Leishmania spp.</i>	20
Figura 5 – Representação esquemática das formas de detecção da <i>Leishmaniose spp.</i> em humanos.....	20
Figura 6 – Esquema geral do biossensor, apresentando possibilidades de sondas e transdutores.....	25
Figura 7- Nomeclatura utilizada para sensores eletroquímicos, resultante da ligação entre os analitos analisados pela plataforma eletroquímica.....	29
Figura 8 – Representação esquemática de um anticorpo.....	31
Figura 9 – Representação da variação do potencial com o tempo em voltametria cíclica.....	32
Figura 10 – Placa de ELISA para realização de testes imunológicos.....	51
Figura 11- Representação limpeza eletroquímica. Limpeza eletroquímica da superfície do eletrodo de grafite eletrodepositado com ouro.....	55
Figura 12 – Comparação entre os eletrodos: eletrodepositado com ouro (A) e grafite virgem (B).....	56
Figura 13 – Voltamogramas cíclicos em diferentes plataformas, comparativo com negativo.....	56

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1 – Lista de doenças negligenciadas definidas pela Organização Mundial da Saúde (OMS).....	15
Tabela 2 – Modificações nas plataformas eletroquímicas.....	26
Tabela 3 – Fenômenos que contribuem para o aumento da sensibilidade e especificidade dos EQM.....	27
Tabela 4 – Técnicas para imobilização da biomolécula.....	29
Tabela 5 – Representação dos valores obtidos por Índice ELISA (IE) das amostras (A:.).....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ac – Anticorpo

Ag – Antígeno

Au - ouro

BSA – Albumina Sérica Bovina

ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Fab – Fragment antigen-binding (Fragmento de ligação do antígeno)

Fc – Fragmento cristalizável ou cristal fraction

$[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ / $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ – Ferri/Ferrocianeto iônicos

$\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ / $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ – Ferri/Ferrocianeto de potássio

KCl – Cloreto de Potássio

LV – Leishmania Visceral

NCs - Nanocristais

NPs – Nanopartículas

OMS – Organização Mundial da Saúde

OPAS – Organização Pan Americana da Saúde

PCR – Polymerase Chain Reaction

VC – Voltametria Cíclica

PBS - Phosphate Buffered Saline

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 LEISHMANIOSES	16
1.2 CICLO DE VIDA DAS LEISHMANIOSES	18
1.3 DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSES	20
1.3.1 Diagnóstico Clínico	21
1.3.2 Diagnóstico Parasitológico	21
1.3.3 Diagnóstico Imunológico	22
1.3.4 Diagnóstico Molecular	23
1.4 REATIVIDADE CRUZADA	23
2 BIOSSENSORES	25
2.1 ELETRODOS QUIMICAMENTE MODIFICADOS (EQM)	26
2.1.1 Eletrodeposição de Ouro	28
2.2 IMUNOSSENSORES	30
2.3 TÉCNICAS ELETROQUÍMICAS E VOLTAMETRIA CÍCLICA	32
REFERÊNCIAS	33
APÊNDICE A - ARTIGO EM INGLÊS	37
APÊNDICE B - DADOS SUPLEMENTARES	51
APÊNDICE D - LISTA DE PARTICIPAÇÃO DE CO-AUTORES	53
ANEXO A - RESULTADOS COMPLEMENTARES	55
ANEXO B - NORMAS DA REVISTA CIENTÍFICA	57

1 INTRODUÇÃO

As doenças negligenciadas, relacionadas a baixo financiamento em pesquisas que independem do número de casos, estão entre o rol de enfermidades que necessitam de diagnóstico com baixo custo. A Organização Mundial da Saúde (OMS) é responsável por relatar em suas avaliações as enfermidades que se enquadram entre as doenças negligenciadas (tabela 1). Com isso, pesquisadores buscam aprimorar sistemas de pesquisa, a fim de, propiciar um rápido diagnóstico que auxilie na escolha do tratamento mais adequado para a cura do paciente, ou pelo menos monitoramento.

Tabela 1: Lista de doenças negligenciadas definidas pela Organização Mundial da Saúde (OMS).

Doenças negligenciadas
Úlcera de Buruli
Doença de Chagas
Dengue e Chikungunya
Dracunculíase (doença do verme da Guiné)
Equinococose
Trematodíases alimentar
Tripanossomatíase humana africana (doença do sono)
Leishmaniose
Hanseníase (hanseníase)
Filariose linfática
Micetoma; cromoblastomicose e outras micoses profundas
Oncocercose (cegueira dos rios)
Raiva
Sarna e outros ectoparasitas
Esquistossomose
Helmintíases transmitidas pelo sono
Envenenamento de picada de cobra
Taenia/Cisticercose
Tracoma
Yaws (treponematoses endêmicas)

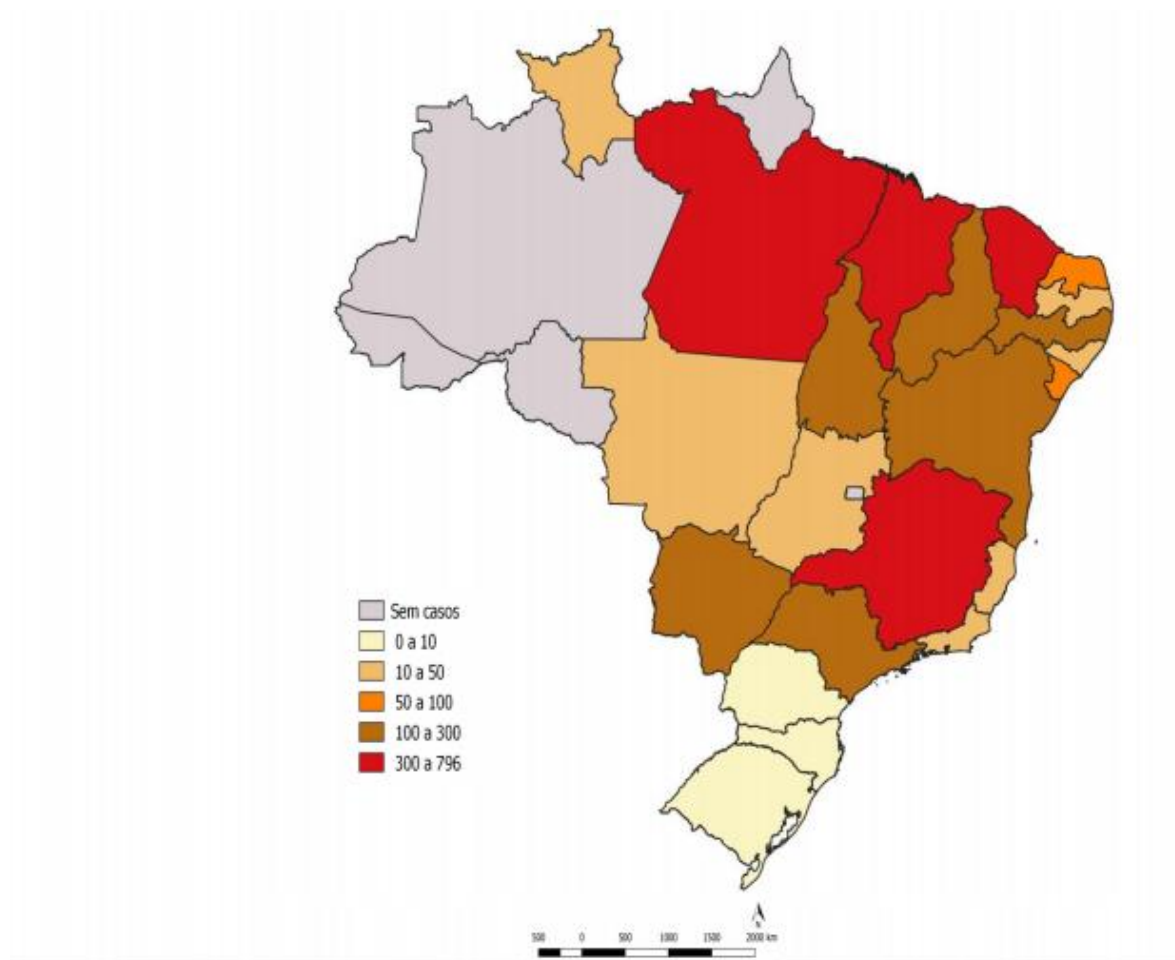
(OMS, 2017).

1.1 LEISHMANIOSES

As Leishmanioses são doenças infecciosas, porém, não contagiosas. Como o público afetado por essas enfermidades possuem baixo poder aquisitivo, não há o “olhar” de grandes empresas no financiamento em pesquisa diagnóstica (Rosário et. al, 2017). Essas enfermidades são um grupo de doenças negligenciadas provocadas por um protozoário do gênero *Leishmania*, transmitidas por um vetor muito prevalente em regiões tropicais e subtropicais, fêmea do flebotomíneo, também conhecido como mosquitos-palha (Ordem Diptera; Família Psychodidae; Sub-Família Phlebotominae) (Basano, 2004; Netto, 2009).

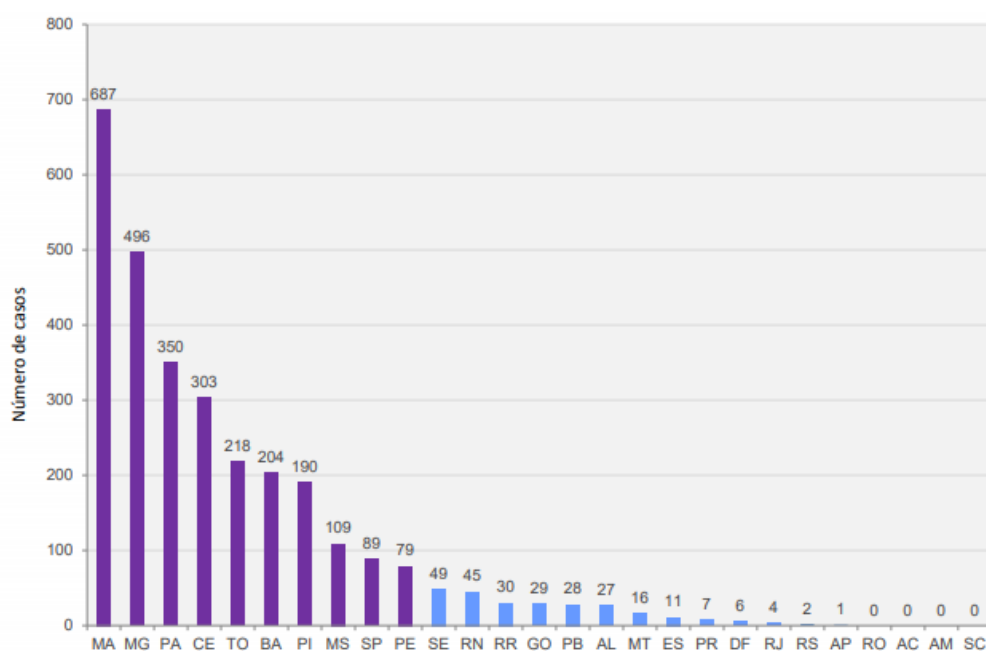
As infecções por Leishmanioses são de distribuição mundial. A doença é endêmica nas regiões tropicais e subtropicais de 98 países, prevalecendo em regiões como África, América Latina e Ásia. (Conceição-Silva; Leite-Silva; Morgado, 2018). Existem cerca de 12 milhões de casos em todo o mundo; 1,5 a 2 milhões de novos casos ocorrem a cada ano (Sundar; Rai, 2002).

O primeiro a observar o parasita do gênero *Leishmania* foi Cunningham (1885), na Índia, em casos de leishmaniose visceral. A saber, 90% de todos os casos de Leishmaniose visceral ocorrem no Brasil (Figura 1), Bangladesh, Índia e Sudão (Basano, 2004). As leishmanioses podem ser subdivididas em dois grupos: a Leishmaniose Tegumentar (LT) e a Leishmaniose Visceral (LV). De acordo com o Ministério da Saúde em 2017, o Estado de Minas Gerais, era o segundo com maior índice de casos de Leishmanioses no Brasil (Figura 2).



Fonte: SVS/MS,2017.

Figura 1: Representação de regiões endêmicas de *Leishmania spp.* no Brasil. Estados com maior índice de casos de acordo com as cores: vermelha (maior), marrom, alaranjado, salmão, rosé, cinza (menor).



Fonte: SVS/MS,2017.

Figura 2: Avaliação de número de casos de *Leishmania spp.* nos estados brasileiros. O estado de Minas Gerais é localizado como o segundo no ranking nacional de incidência da doença.

A Leishmaniose Tegumentar (LT) pode apresentar diferentes formas clínicas, variando de lesões únicas a múltiplas, localizadas ou disseminadas, ulceradas na pele ou membranas mucosas. As principais espécies de parasitas responsáveis por essa doença na América do Sul, especialmente no Brasil, são *Leishmania braziliensis* e *Leishmania amazonenses* (Pires et. al, 2018).

A Leishmaniose Visceral também conhecida por seu nome indiano “calazar” (kala-azar) - é uma doença não contagiosa causada, entre outros, por três espécies de protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania*, clínica e biologicamente distintas e com diferentes distribuições geográficas: *Leishmania donovani*, *Leishmania infantum*. No Brasil há prevalência de *Leishmania infantum*, o teste diagnóstico com rK39 é feito com *Leishmania donovani*, parasita que não circula no Brasil.

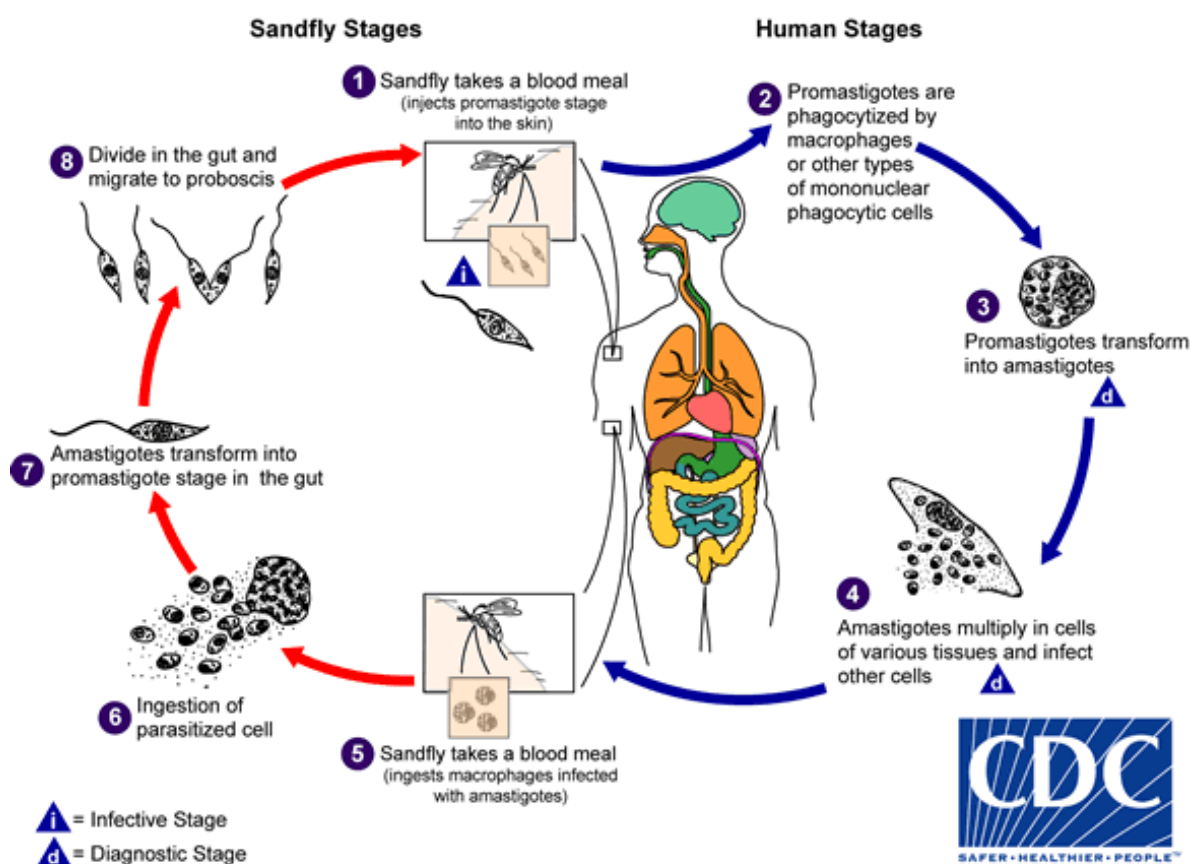
No caso humano os parasitos são transportados pela corrente sanguínea por todo o corpo, afetando principalmente os órgãos com considerável concentração de leucócitos - com destaque para medula óssea, fígado, baço e linfonodos - onde se instalam, levando quase sempre a anomalias no tamanho destes, conhecidas como hepatomegalia (fígado), esplenomegalia (baço) e adenomegalia (linfonodos). O período de incubação é variado, podendo chegar a 2 anos, e na ausência de tratamento adequado, a doença é fatal em quase 100% dos casos.

1.2 CICLO DE VIDA DAS LEISHMANIOSES

A principal forma de transmissão do parasita para o homem e outros hospedeiros mamíferos (Figura 3 e 4) é através da picada de fêmeas infectadas de dípteros da família Psychodidae, sub-família Phlebotominae, conhecidos genericamente por flebotomíneos (GONTIJO e MELO 2004).

De acordo com o CDC 2015, as formas promastigotas são transmitidas ao hospedeiro através da picada das fêmeas de flebotomíneos e ao caírem na corrente sanguínea são fagocitados por macrófagos e outros tipos de células fagocíticas mononucleares. Os promastigotas se transformam nessas células no estágio amastigotas, que se multiplicam por simples divisão e passam a infectar outras células fagocíticas mononucleares. A partir deste momento, as fêmeas do inseto são infectadas pela ingestão de células durante as refeições de sangue. Nos flebotomíneos, os amastigotas se transformam em promastigotas,

desenvolvem-se no intestino e migram para a tromba onde estão peraradas para infectar outros hospedeiros e reiniciar o ciclo.



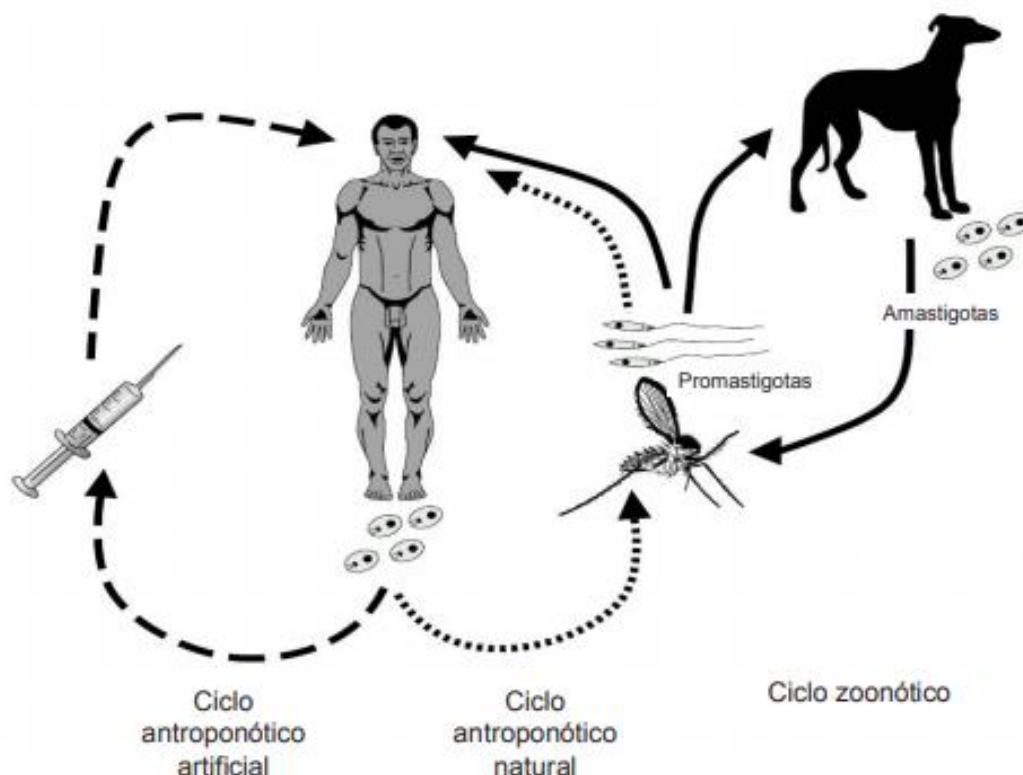
Fonte: CDC, 2015

Figura 3: Representação esquemática do ciclo de infecção antroponótico natural de casos de *Leishmania* spp. Onde são simbolizados os estágios de infecção e de diagnóstico da doença. A detecção do parasita no humano é possível, a partir do momento em que o promastigota se transforma em amastigota.

Os ciclos de infecção por Leishmanioses podem ocorrer através de diferentes ciclos (Figura 4). O ciclo antroponótico natural foi anteriormente explicado através do esquema proposto pela CDC-2015. No ciclo antroponótico artificial, as formas amastigotas do parasita são transmitidas através de elementos perfurantes e/ou cortantes contaminadas com o parasita, garantindo a perpetuação do ciclo.

Por fim, o ciclo zoonótico se assemelha ao ciclo antroponótico natural, as formas promastigotas são transmitidas ao hospedeiro animal através da picada das fêmeas de flebotomíneos e ao caírem na corrente sanguínea são fagocitados por macrófagos e outros tipos de células fagocíticas mononucleares. Os promastigotas se transformam nessas células no estágio amastigotas, que se multiplicam por simples divisão e passam a infectar outras células fagocíticas

mononucleares. A partir deste momento, as fêmeas do inseto são infectadas pela ingestão de células durante as refeições de sangue. Nos flebotomíneos, os amastigotas se transformam em promastigotas, desenvolvem-se no intestino e migram para a tromba onde estão peraradas para infectar outros hospedeiros (animal ou humano) e reiniciar o ciclo.



Fonte: Nunes et. al, 2007

Figura 4: Representação esquemática do ciclo de infecção zoonótico, antroponótico natural e artificial de casos de *Leishmania* spp.

1.3 DIAGNÓSTICOS DE LEISHMANIOSES

O diagnóstico das Leishmanioses é feito pela combinação de sinais (Figura 5) clínicos com testes parasitológicos ou sorológicos (principalmente testes de diagnóstico rápido da LV) (OPAS, 2014; Netto, 2009).



Figura 5: Representação esquemática das formas de detecção da *Leishmaniose* spp. em humanos. O diagnóstico clínico para Leishmaniose se baseia na avaliação de sinais e sintomas apresentados

pelo paciente. Já o parasitológico consiste na análise de material coletado, onde o parasita pode ser demonstrado. E o diagnóstico imunológico é baseado na análise de sinais imunológicos presentes nos soros dos pacientes, esta técnica é menos invasiva.

Os sinais clínicos são inicialmente avaliados pelo médico clínico, durante consultas. Os pacientes avaliados nos testes clínicos podem ser divididos em sintomáticos clássicos (apresentam sintomas típicos da doença), oligossintomáticos (apresentam alguns sintomas da doença, esses sintomas podem ser confundidos com uma outra forma) e os assintomáticos (pacientes portadores da enfermidade que não apresentam sintomas clínicos).

Sabendo que os exames para diagnosticar a Leishmaniose Visceral envolvem observações dos sinais clínicos juntamente com auxílio de técnicas parasitológicas, imunológicas e moleculares. E, os testes laboratoriais dependem de mão de obra qualificada e elevado tempo para sua realização. Os pesquisadores, constantemente relatam e avaliam o desempenho e custos diretos de kits comercialmente disponíveis no Brasil (Freire, 2017).

1.3.1 DIAGNÓSTICO CLÍNICO

Na forma clínica, a doença pode ser classificada em: assintomática, oligossintomática e sintomática. A infecção assintomática ocorre em área endêmicas, sendo que esta pode evoluir para cura, manifestações brandas (forma oligossintomática) ou manifestações clínicas mais graves (forma sintomática) (MS-Brasil, 2014).

Na Leishmaniose visceral, tanto em crianças como em adultos, manifesta-se após período de dois a seis meses de incubação, com o seguinte quadro clínico sintomático: Febre recorrente, palidez cutâneo-mucosa, diarreia, tosse e aumento do volume abdominal. Os exames complementares demonstram: anemia, leucopenia, trombocitopenia e elevação dos níveis de ureia-creatinina-bilirrubinas. Caso não haja o diagnóstico correto e tratamento imediato, há o agravamento do estado geral, podendo levar o paciente a óbito (Oliveira et.al, 2010; MS-Brasil, 2014; Sena 2018).

1.3.2 DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO

Os exames parasitológicos são os mais comumente utilizados para fechar diagnóstico de LV demonstrando diretamente o parasita em tecidos ou isolados em

cultura. O procedimento demanda de uma técnica invasiva e a especificidade e a sensibilidade varia com o tecido a ser analisado (Catorze 2005). A medula óssea, frente ao risco da coleta, apresenta baixa sensibilidade cerca de 52 a 85% (Srivastava 2011).

A técnica de isolamento em cultura utiliza o meio de cultura para que aspirados esplênicos ou de medula óssea tenham suas formas amastigotas transformam em promastigotas (MS-Brasil 2014). Após a incubação, estas são avaliadas em períodos de uma a quatro semanas. O prazo necessário para confirmação do resultado torna esta técnica menos usada (Sakkas 2016).

1.3.3 DIAGNÓSTICO IMUNOLÓGICO

Os principais meios de diagnóstico imunológicos da LV apresentam relativa sensibilidade. A especificidade é dependente ao tipo de antígeno utilizado na detecção de anticorpos.

São comumente utilizadas as técnicas: RIFI (Reação de imunofluorescência indireta), o teste imunocromatográfico rápido, ELISA e o teste de aglutinação direta (DAT, do inglês “direct agglutination test”).

- RIFI

Consiste na reação entre soros com o extrato bruto de parasitas promastigotas (*Leishmania*), fixados em lâminas de microscopia. Numa etapa seguinte, utiliza-se um conjugado fluorescente para se evidenciar a interação. O microscópio de fluorescência é utilizado na detecção (MS-Brasil 2014).

- Testes imunocromatográficos

Teste rápido qualitativo de anticorpos no soro a partir de um antígeno recombinante RK39 *L.(L.) danovani*. A análise das bandas na área C e na área T permite o resultado positivo. A K39 (rK39), descrito pela primeira vez em 1993, tem sido o mais largamente utilizado em regiões endêmicas de *L. danovani*. Consiste uma sequência de 39 aminoácidos isolada de *L. danovani*, clonada e expressa em *Escherichia coli* (Burns et al., 1993; Maia, 2012).

- Ensaio Imunoenzimático

A técnica de ELISA utiliza antígenos aderidos à placa para a detecção dos anticorpos. O antígeno solúvel bruto, obtido através de ciclos de congelamento e descongelamento das formas promastigotas de *Leishmania*, sendo o sobrenadante

usado como antígeno (Fonseca 2013). A técnica de ELISA tem baixa especificidade, assim não limita a reatividade cruzada.

- DAT – Teste de Aglutinação Direta

A técnica combina altos níveis de validade intrínseca e facilidade de execução, embora apresente problemas na padronização e controle de qualidade do antígeno e não tenha valor no prognóstico da doença. Uma variação da DAT, o Fast Agglutination Screening Test (FAST), foi criado para detecção de anticorpos anti-Leishmania em amostras sanguíneas. O teste é baseado no DAT, porém combina uma concentração parasitária mais alta com um menor volume de teste. A técnica permite uma varredura rápida de um grande número de amostras (Souza, 2013).

1.3.4 DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Constitui em identificar uma sequência de DNA dos parasitas, através de amostra (sangue periférico e aspirado de medula óssea). Essa tecnologia diagnóstica apresenta elevado custo para a sua execução.

São utilizados iniciadores, enzima DNA polimerase e desoxinucleotídeos trifosfatados, que são adicionados pela polimerase, na área delimitada pelos iniciadores. Com o processo de desnaturação da fita molde há o aumento da sequência específica. Devido à variação na temperatura e com ciclos alternados acontece a ligação entre os iniciadores e a extensão.

Existem kits comerciais de PCR convencional, porém a dificuldade de padronização nos ensaios de PCR a determinação de um protocolo uniforme a fim de comparação de resultados se faz necessário (Faria, 2012; Moradi, 2016).

1.4 REATIVIDADE CRUZADA

O soro de pacientes é um meio complexo que apresenta diversificadas biomoléculas, com propriedades bioquímicas únicas, que podem interferir no diagnóstico destoante da realidade. Assim, as respostas imunológicas são diversas em pacientes, como prova de conceito a Leishmaniose, pode ser manifestada nos indivíduos de forma assintomática, oligossintomática ou sintomática.

Em estudos de casos é possível observar a ligação de anticorpos que possuam epítipo semelhante ao antígeno. Esta similaridade tridimensional pode

gerar interação, mesmo com ligações fracas e /ou afinidade baixa, gerando um resultado falso- positivo ou falso-negativo (Fonseca et al., 2011; Gomes, 2011).

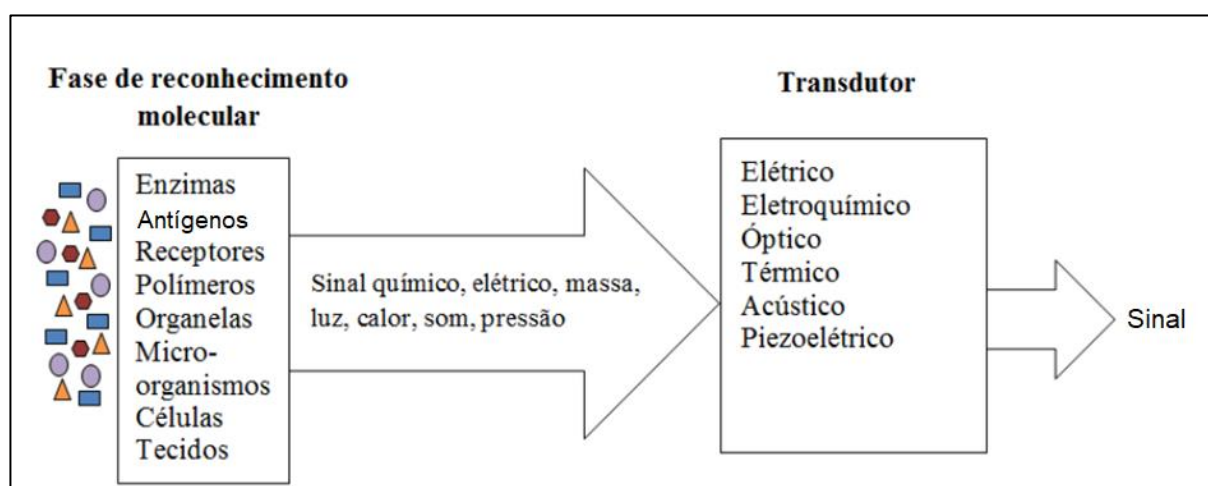
Os estudos realizados por Camargo (1969), Maywald (1996), Islam (2002) e Matos (2015), demonstraram: que testes sorológicos apresentavam reações cruzadas entre Leishmaniose Visceral e doença de Chagas. Neste momento, alertava-se a necessidade de um método diagnóstico discriminatório.

Em estudos anteriores, foi alertado que no caso do uso de extrato bruto ou antígenos semi-purificados, reações cruzadas do gênero *Leishmania spp* são recorrentes em virtude de sua proximidade filogenética com o *T. cruzi*. Assim, o estudo alerta sobre a necessidade de realizar avaliações sistemáticas dos testes sorológicos disponíveis comercialmente e verificar a necessidade da busca de antígenos que apresentem elevada acurácia, mesmo quando os testes forem realizados em áreas de co-endemicidade (Daltro et.al., 2018).

2 BIOSSENSORES

Biossensores são sistemas analíticos constituídos por elementos biológicos, derivados biológicos, materiais biológicos sintéticos que são conectados a superfície de transdutores físico-químicos ou microssistemas integrados, eletroquímicos, ópticos, magnéticos, micromecânicos, piezoelétricos ou termométricos (Lakcka et al., 2007).

O princípio do biossensor é que este esteja conectado a um transdutor e transforme o sinal biológico em um sinal elétrico, possibilitando assim a quantificação dos sinais (Figura 6).



Fonte: Machado, 2015 (adaptado).

Figura 6: Esquema geral do biossensor, apresentando possibilidades de sondas e transdutores.

Esforços têm sido realizados buscando melhorar a confiança de modo a obter um sensor com desempenho desejado em termos de sensibilidade, alcance dinâmico e reprodutibilidade (Silva, 2011; Saraf, 2012).

O desenvolvimento deste procedimento pode contribuir com a otimização de uma plataforma portátil e importante ferramenta para a melhoria do diagnóstico. Partindo deste princípio, algumas modificações no eletrodo de trabalho podem ser utilizadas.

As principais são: matérias ou materiais adsorvidos, ligados covalentemente, uso de filmes poliméricos imobilização por oclusão e eletrodeposição (Freire et al., 2003; Barbieri, 2017; De Meneses, 2018). Essas modificações apresentam vantagens e desvantagens que devem ser analisadas de acordo o interesse da pesquisa (Tabela 2).

Tabela 2: Modificações nas plataformas eletroquímicas

Método	Vantagem	Desvantagem	Referência
Adsorção	Simplicidade; Alta eficiência;	Limitação da faixa de resposta linear; Alta incidência de perda de reprodutibilidade; Redução da vida útil do EQM.	(Pereira, 2002; De Meneses, 2018)
Ligação covalente	Estável;	Muito tempo para a realização; difícil execução; Limitação da faixa de resposta linear;	(Pereira, 2002; De Meneses, 2018)
Filmes poliméricos	Ampliação na resposta eletroquímica; Aumento na a velocidade de transferência dos elétrons;	Alto tempo de execução; PH da solução; Tempo de execução.	Pereira, 2002; De Meneses, 2018; Balvedi, 2014; Alves-Balvedi, 2016)
Imobilização por oclusão	Componente biológico não se liga a matriz; Evita diminuição da atividade enzimática que pode ocorrer por imobilização;	Possibilidade de lixiviação; Propriedades não condutoras do gel; Perda de resposta.	(Pereira, 2002; De Meneses, 2018)
Eletrodeposição	Seletividade; Promove a reatividade desejada;	Tempo de execução.	(De Meneses, 2018)

Formas de otimização de uma plataforma portátil e importante ferramenta para a melhoria do diagnóstico e detecção dos biossensores eletroquímicos. A análise dessas otimizações faz-se necessária na busca da obtenção de uma melhor forma de detecção da *Leishmaniose spp.* em humanos.

2.1 ELETRODOS QUIMICAMENTE MODIFICADOS (EQM)

Algumas técnicas foram desenvolvidas para o desenvolvimento dos eletrodos, sendo mais a inserção de camadas modificadoras sobre a superfície dos eletrodos

(Barbieri, 2017). Assim, aperfeiçoamentos podem ser feitos e tornar diversificadas as possibilidades de aplicação das plataformas diagnósticas.

Do ponto de vista analítico a sensibilidade e/ou a seletividade devem aumentar com a utilização de um EQM para que seu uso seja justificado. Isto pode ser obtido por meio de um ou mais dos seguintes fenômenos: 1- pré-concentração, 2- eletrocatalise e 3- exclusão de interferentes (Souza, 1997).

Esses fundamentos estão diretamente ligados com o aumento da seletividade nas plataformas diagnósticas. Assim, faz-se necessária a avaliação desses princípios (Tabela 3) durante o processo de escolha metodológica.

Tabela 3: Fenômenos que contribuem para o aumento da sensibilidade e especificidade dos EQM

Fundamento	Objetivo(s)	Referência
Eletrocatalise	Reduzir a energia de ativação da reação. Busca o aumento da sensibilidade.	(Souza, 1997; Pereira et.al., 2002)
Pré- Concentração	Aumento na componente faradaica da corrente; Elevação na sensibilidade da técnica voltamétrica utilizada; Aumento da seletividade	(Souza, 1997; Pereira et.al., 2002)
Exclusão de Interferentes	Inibir a ação de interferentes que mascaram a resposta eletroquímica da espécie de interesse.	(Souza, 1997; Pereira et.al., 2002)

Fenômenos eletroquímicos responsáveis pelo aumento da sensibilidade e especificidade em eletrodos quimicamente modificados, esses fenômenos influenciam na otimização dos sensores eletroquímicos.

Freire et al., 2003, revelaram que as monocamadas exibem uma homogeneidade capaz de gerar sensores mais sensíveis e reprodutivos que reduzem as correntes residuais não faradáticas e a passivação na superfície do eletrodo. Estudos anteriores à inserção de monocamadas devem ser realizados, a fim de, realizar uma investigação a respeito de propriedades e funções que proporcionem a ligação superfície-analito.

De acordo com Angnes e Nascimento (1998), um marco para os avanços e aperfeiçoamentos das plataformas “silk-screen”, foi à década de 70, período em que

se teve uma expansão no aprimoramento dessa metodologia. Os estudos revelaram que a modificação de superfícies ampliaria a possibilidade para criação de diversos sensores. A forma de preparação de um eletrodo quimicamente modificado é determinada pela característica analítica desejadas no sensor (Pereira et al., 2002).

2.1.1 ELETRODEPOSIÇÃO DE OURO

A eletrodeposição de ouro é capaz de promover reatividade e seletividade desejadas. Além da potencialização das respostas em plataformas diagnósticas, como também permitiu a melhor interação das sondas à superfície (Janegitz, 2007; Barbosa, 2012).

Comparando os eletrodos screen-printed de ouro ao eletrodo de grafite, observamos que este é capaz de minimizar algumas alterações cinéticas de transferência de elétrons entre analito e a superfície eletródica. A superfície de ouro, por exemplo, pode alterar e aumentar esta transferência que estava lenta o suficiente, atrapalhando a detecção de compostos ou a discriminação entre grupos redox semelhantes (Freire, 2003; Galli et al, 2006; Prakash, 2013).

A eletrodeposição de ouro é responsável por aumentar a área superficial do eletrodo base e promover, nos imunossensores, um maior sítio de imobilizações de antígenos (Ag) (Chu, 2016; Fonseca et.al, 2011). Essa técnica eletroquímica de modificação da superfície do eletrodo é responsável por organizar configurações de cargas e/ou aumentar a superfície de contato entre plataforma eletroquímica e analito.

Esse tipo de modificação apresenta vantagens experimentais extras sobre a utilização de ouro em biossensores. Além disso, pode-se citar a facilidade de manuseio e preparação, baixo custo, acessibilidade e estabilidade (Chaki, 2002; Silva, 2010; Santos, 2016).

Durante o desenvolvimento de plataformas diagnósticas alguns passos são fundamentais. A escolha da plataforma base, modificação ou não da superfície são importantes para a escolha do biossensor, porém a biomolécula imobilizada definirá a classificação do sensor (Figura 7).

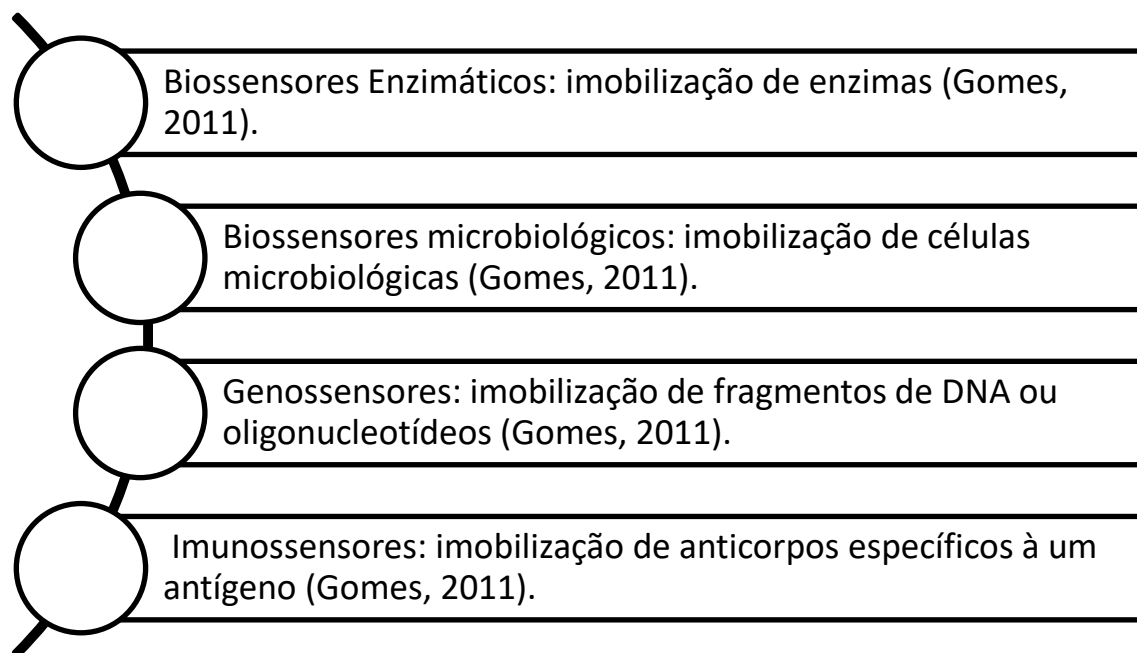


Figura 7: Nomeclatura utilizada para sensores eletroquímicos, resultante da ligação entre os analitos analisados pela plataforma eletroquímica.

De acordo com Barbieri, 2017, as técnicas mais comuns para a imobilização das biomoléculas envolvem adsorção física, ligação covalente, ligação cruzada e aprisionamento ou oclusão. No processo de escolha da técnica, as vantagens e desvantagens (Tabela 4), devem ser selecionadas de acordo com o resultado esperado.

Tabela 4: Técnicas para imobilização da biomolécula

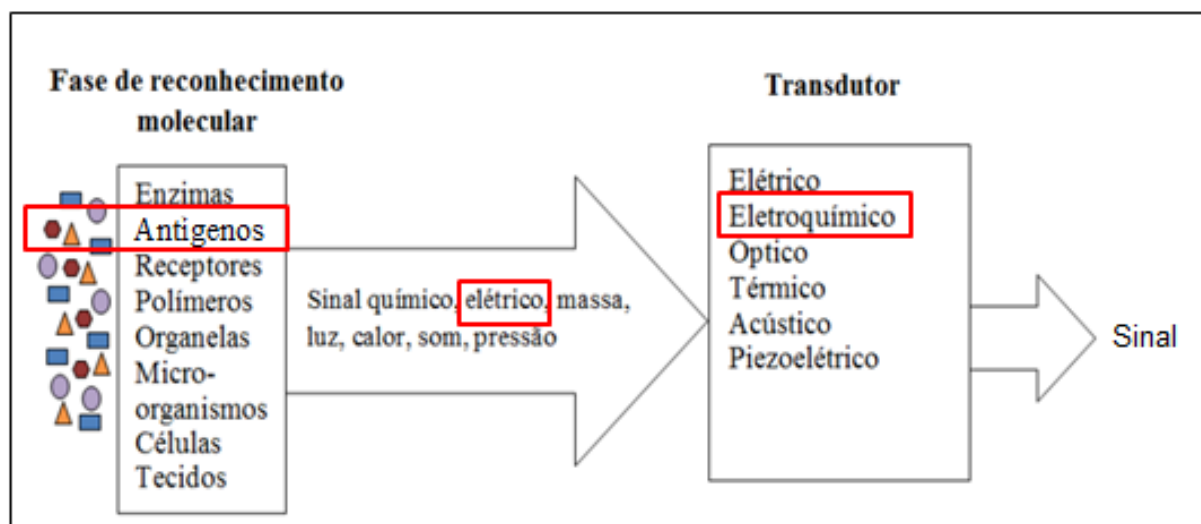
Método	Vantagens	Desvantagens	Referências
Adsorção física	Simplicidade; Não exige modificação química; Menor dano à biomolécula;	Influenciada por fatores como pH, solvente e temperatura. Baixa estabilidade;	Gomes, 2011; Barbieri, 2017
Ligação covalente	Difícil desprendimento do componente biológico à matriz suporte (estabilidade); Ligação específica (biomolécula-matriz); Ideal para produção em massa e comercialização;	Complexidade; Elevado tempo de produção; Possível perda de atividade de grupos essenciais;	

Oclusão	Simples; Não sofre interferência do meio;	Resistência difusional; Possível desnaturação da biomolécula;	
Ligação cruzada	Simples; Ligações químicas fortes;	Difícil controle; maior quantidade de biomolécula; baixa sensibilidade;	

Apresentação de técnicas para imobilização da biomolécula. As técnicas para imobilização da biomolécula apresentam semelhança significativa, mas apresentam diferentes mecanismos de ação sobre a biomolécula analisada.

Na adsorção física um solvente é utilizado para a diluição da biomolécula e a solução é imobilizada no eletrodo. A ligação covalente envolve processos de ligação química entre o substrato e a biomolécula. Já a ligação cruzada permite a ligação das moléculas que formam uma rede tridimensional sobre a superfície da plataforma. Por fim, na oclusão, a biomolécula é aprisionada no interior das ligações covalentes que formaram a matriz polimérica.

2.2 IMUNOSSENSORES



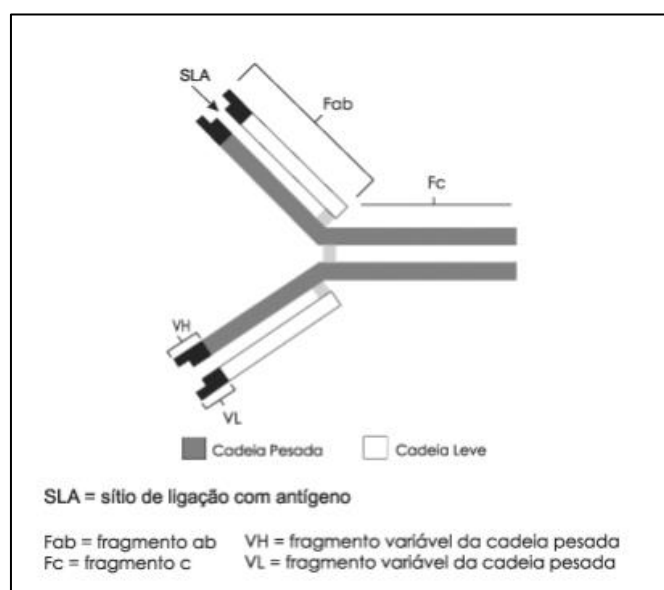
Fonte: Machado, 2015 (adaptado).

Figura 6: Esquema geral do biossensor, apresentando possibilidades de sondas e transdutores. Neste esquema, os alvos de interesses para realização do imunossensor proposto estão destacados.

De acordo com a patologia, selecionamos o elemento de biorreconhecimento. No caso das patologias avaliadas os anticorpos representam as moléculas alvo de detecção e assim, desenvolveremos um imunossensor (Lemos, 2017; Barbieri, 2017). Os Ac possuem dois sítios ou porções variáveis (Fab) que ligam-se aos

antígenos (Ag) e uma porção cristalizável (Fc) determinante na variação de classes diferentes de anticorpos (Figura 8).

A preparação do antígeno de *Leishmania infantum* para realização dos testes eletroquímico consistiu em algumas etapas, anteriormente padronizadas. A extração PP75 de *L. infantum* cultivada em meio Schneider, suplementado com 20% de soro bovino fetal, na fase exponencial foi centrifugada 2000xg, 25 ° C por 20 minutos e depois lavada 3 vezes com PBS e sobrenadante descartado. O sedimento foi ressuspenso em PBS, contendo 0,05% de NP40 com o inibidor de protease COMPLETETM (ROCHE, SWI). O antígeno foi obtido pelo método de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento a 37 ° C e centrifugado a 10000xg por 30 minutos e o sobrenadante contendo o antígeno bruto solúvel foi armazenado a -80 ° C até o momento da utilização. A concentração proteica do antígeno foi determinada pelo método de Lowry (Lowry et al., 1951). Alíquotas do extrato foram armazenadas



com os antígenos solúveis totais a -80 ° C até o uso posterior.

Fonte: Barbieri, 2017.

Figura 8: Representação esquemática de um anticorpo

Dessa forma, a imobilização de forma ordenada e orientada do anticorpo na superfície do transdutor é extremamente importante. Para a correta ligação, a porção Fc deve ser ligada ao transdutor para manter as porções Fab livre o reconhecimento com o antígeno presente (Ferreira e Yamanaka, 2006).

A imobilização da biomolécula sobre a superfície do transdutor é um passo crucial no desenvolvimento dos imunossensores, pois deve permitir a exposição da área de atividade biológica de reconhecimento.

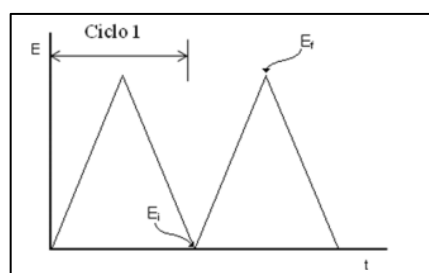
A escolha do método apropriado varia de acordo com as condições operacionais do sistema, gerando dados confiáveis e de qualidade (Kongsuphol et al., 2014; Barbieri, 2017).

2.3 TÉCNICAS ELETROQUÍMICAS E VOLTAMETRIA CÍCLICA

As técnicas eletroquímicas compreendem a análise de eventos que envolvem oxidação e redução. Essas técnicas estudam propriedades elétricas mensuráveis como potencial e corrente de um analito numa célula eletroquímica submetido a uma diferença de potencial (Barbieri, 2017).

A Voltametria Cíclica (VC) é uma técnica utilizada para adquirir informações qualitativas e quantitativas sobre processos eletroquímicos. Seu principal uso é a detecção de espécies eletroativas presentes na solução eletrolítica (Barbieri, 2017).

As informações sobre o analito são obtidas por meio da medição da magnitude da corrente elétrica obtida pela transferência de elétrons durante o processo de oxirredução. A quantidade de analito presente na interface do eletrodo e na célula eletroquímica é correlacionada com a magnitude da corrente gerada. E o registro da corrente em função do potencial é denominado voltamograma (Figura 9) (Barbieri, 2017).



Fonte: Barbieri, 2017.

Figura 9 - Representação da variação do potencial com o tempo em voltametria cíclica

Constantemente, o desenvolvimento de técnicas que possuam características relacionadas à rápida execução, bom custo-benefício, fácil manuseio e ampla faixa de detecção, tornam-se essenciais para contribuir com o diagnóstico precoce das doenças negligenciadas.

Portanto, a partir da análise da literatura e com a finalidade diminuir o tempo de análise, facilitar os processos de detecção, melhorar a sensibilidade e reduzir custos, propõe o desenvolvimento de um imunossensor eletroquímico para detecção de Leishmaniose visceral e que suprima reações cruzadas com doença de Chagas.

REFERÊNCIAS

- ALVES-BALVEDI, R. P. et al. Use of 3, 3', 5, 5'tetramethylbenzidine as new electrochemical indicator of DNA hybridization and its application in genossensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 85, p. 226-231, 2016.
- ANGNES, Llicio; NASCIMENTO, V. Eletrodos fabricados por "silk-screen". **Química Nova**, v. 21, p. 5, 1998.
- BALVEDI, Renata Pereira et al. Detection of a Specific Biomarker for Epstein-Barr Virus Using a Polymer-Based Genosensor. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 5, p. 9051-9066, 2014.
- BARBIERI, Gilcelia Janaina Lino da Silva. **Desenvolvimento de imunossensores eletroquímicos para detecção de aflatoxina B1 em alimentos**. 2017. Tese de Doutorado.
- BARBOSA, Tatielli Gonçalves Gregório et al. Determinação eletroquímica de glicerol em biodiesel por amperometria de múltiplos pulsos com eletrodo de ouro. 2012.
- BASANO, Sergio de Almeida & CAMARGO, Luís Marcelo Aranha. American cutaneous leishmaniasis: history, epidemiology and prospects for control. **Rev. Bras. Epidemiol.** v. 7, n. 3, p. 328- 337, 2004
- BURNS, James M. et al. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of Leishmania chagasi that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 2, p. 775-779, 1993.
- CAMARGO, Mário E.; REBONATO, C. Cross-reactivity in fluorescence tests for Trypanosoma and Leishmania antibodies. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 18, n. 4, p. 500-505, 1969.
- CATORZE, Maria Goreti Baião. Leishmaniose e SIDA. **Medicina Cutânea Ibero-Latino-Americana**, v. 33, n. 6, p. 237-250, 2005.
- CHAKI, Nirmalya K.; VIJAYAMOHANAN, K. Self-assembled monolayers as a tunable platform for biosensor applications. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 17, n. 1-2, p. 1-12, 2002.
- CHU, Xia et al. Quartz crystal microbalance immunoassay with dendritic amplification using colloidal gold immunocomplex. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 114, n. 2, p. 696-704, 2006.
- CONCEIÇÃO-SILVA, Fatima; LEITE-SILVA, Jessica; MORGADO, Fernanda Nazaré. The Binomial Parasite-Host Immunity in the Healing Process and in Reactivation of Human Tegumentary Leishmaniasis. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 1308, 2018.
- DALTRO, Ramona Tavares et al. Avaliação da reatividade cruzada de testes sorológicos para Doença de Chagas crônica em indivíduos infectados com Leishmaniose Cutânea e Visceral. 2018.
- DE MENESES, Henrique Pereira Andrade. **Sensores eletroquímicos empregados na detecção de doenças negligenciáveis**. Monografia, 2018.
- DE OLIVEIRA, Janaina Michelle et al. Mortalidade por leishmaniose visceral: aspectos clínicos e laboratoriais. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 43, p. 188-193, 2010.
- FARIA, Angélica Rosa & ANDRADE, Hélida Monteiro. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: major technological advances and few practical applications- Review. **Rev Pan-Amaz Saude** v. 3, n.2, p. 47-57, 2012.
- FERREIRA, Antonio Aparecido Pupim; YAMANAKA, Hideko. Microscopia de força atômica aplicada em imunoensaios. **Química Nova**, p. 137-142, 2006.

- FONSECA, Giuliana Schmidt França. **Avaliação do desempenho de diferentes métodos no diagnóstico laboratorial da leishmaniose visceral humana**. 2013. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Espírito Santo.
- FONSECA, Rosana AS et al. A nanostructured piezoelectric immunosensor for detection of human cardiac troponin T. **Sensors**, v. 11, n. 11, p. 10785-10797, 2011.
- FREIRE, Mariana Lourenço et al. **Avaliação de desempenho e custos diretos de kits comercialmente disponíveis no Brasil e do protótipo DAT-LPC para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana**. 2017. Tese de Doutorado.
- FREIRE, Paulo. *Pedagogia do Oprimido*. Rio de Janeiro: Paz e Terra, 1987.
- FREIRE, Renato S. et al. Emprego de monocamadas auto-organizadas no desenvolvimento de sensores eletroquímicos. **Química Nova**, 2003.
- GALLI, Andressa et al. Utilização de técnicas eletroanalíticas na determinação de pesticidas em alimentos. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 105, 2006.
- GOMES, Miquéias Ferreira et al. Caracterização estrutural do poli (ácido 4-hidroxifenilacético) eletropolimerizado sobre eletrodo de grafite e sua aplicação no desenvolvimento de imunossensor amperométrico para diagnóstico de leishmaniose visceral. 2011.
- GONTIJO, Célia Maria Ferreira; MELO, Maria Norma. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, p. 338-349, 2004.
- ISLAM, Mohammad Zahidul et al. Diagnosis of visceral leishmaniasis by enzyme-linked immunosorbent assay using urine samples. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 9, n. 4, p. 789-794, 2002.
- JANEGITZ, Bruno Campos; JUNIOR, Luiz Humberto Marcolino; FATIBELLO-FILHO, Orlando. Determinação voltamétrica por redissolução anódica de Cu (II) em águas residuárias empregando um eletrodo de pasta de carbono modificado com quitosana. **Quim. Nova**, v. 30, n. 7, p. 1673-1676, 2007.
- KONGSUPHOL, Patthara et al. EIS-based biosensor for ultra-sensitive detection of TNF- α from non-diluted human serum. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 61, p. 274-279, 2014.
- LAZCKA, Olivier; DEL CAMPO, F. Javier; MUNOZ, F. Xavier. Pathogen detection: a perspective of traditional methods and biosensors. **Biosensors and bioelectronics**, v. 22, n. 7, p. 1205-1217, 2007.
- LEMOS, Anderson Gonzaga et al. Immunosensor assembled on polymeric nanostructures for clinical diagnosis of C-reactive protein. **Microchemical Journal** v.133, p. 572–576, 2017.
- MACHADO, D. F. Biossensores impressos baseados em peroxidase imobilizada em nanofios de titanato. 2015. Dissertação de Mestrado.
- MAIA, Zuinara et al. Comparative study of rK39 Leishmania antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis: systematic review with meta-analysis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 1, p. e1484, 2012.
- MATOS, Haroldo José de et al. Reação cruzada nos testes sorológicos entre doença de Chagas e leishmaniose visceral em regiões endêmicas para ambas as doenças. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 6, n. 1, p. 65-68, 2015.
- MAYWALD, Paula Guardenho et al. Canine cutaneous and visceral leishmaniasis and Chagas' disease from counties in the Triangulo Mineiro and Alto Paranaíba regions, Minas Gerais State, Brazil. **Cadernos de saude publica**, v. 12, n. 3, p. 321-328, 1996.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília – DF: 2014.

MORADI, M. et al. A label-free, PCR-free and signal-on electrochemical DNA biosensor for *Leishmania major* based on gold nanoleaves. **Talanta**, v. 161, p. 48-53, 2016.

NETTO, Arlindo Urgulino. Parasitologia – Medicina P4. 2009.

OPAS. Organização Pan-Americana de Saúde. Key facts on Neglected Infectious Diseases. Chagas. 2014. [citado em 11 fev 2014] Disponível em: <http://www.paho.org/Hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=24717&Itemid=> Acesso em: 26 de nov. 2018.

PEREIRA, Arnaldo César et al. Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas. **Química Nova**, 2002.

PIRES, Emanuene Galdino et al. Silver-doped 58S bioactive glass as an anti-*Leishmania* agent. **International Journal of Applied Glass Science**, v. 9, n. 1, p. 52-61, 2018.

PIRES, R. C. et al. Distinct *Leishmania* Species Infecting Wild Caviomorph Rodents (Rodentia: Hystricognathi) from Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. v.8, n.12, p. 1-8, 2014.

PRAKASH, Sandur. et al. Polymer thin films embedded with metal nanoparticles for electrochemical biosensors applications. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 41, p. 43-53, 2013.

ROSÁRIO, Mychelle Senra et al. Doenças tropicais negligenciadas: caracterização dos indivíduos afetados e sua distribuição espacial. **Revista Brasileira de Pesquisa em Saúde/Brazilian Journal of Health Research**, v. 19, n. 3, p. 118-127, 2017.

SAKKAS, Hercules; GARTZONIKA, Constantina; LEVIDIOTOU, Stamatina. Laboratory diagnosis of human visceral leishmaniasis. **Journal of vector borne diseases**, v. 53, n. 1, p. 8, 2016.

SANTOS, Cleverson Siqueira et al. DESENVOLVIMENTO DE DIFERENTES DISPOSITIVOS ELETROQUÍMICOS A BASE DE OURO APLICADOS COMO SENSORES E BIOSSENSORES. 2016.

SARAF, Nileshi et al. Colorimetric detection of epinephrine using an optimized paper-based aptasensor. **RSC Advances**, v. 7, n. 77, p. 49133-49143, 2017.

SENA, Tais Soares et al. **Aspectos clínicos e laboratoriais associados ao óbito na leishmaniose visceral humana**. 2018. Tese de Doutorado. Instituto Gonçalo Moniz.

SILVA, Fernanda Oliveira et al. O estado da arte da síntese de semicondutores nanocristalinos coloidais. **Quim. Nova**, v. 33, n. 9, p. 1933-1939, 2010.

SILVA, LM da C. **Desenvolvimento de biossensores eletroquímicos para fenol e uréia com foco na aplicação ambiental**. 2011. Tese de Doutorado.

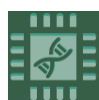
SILVA, LM da C. Desenvolvimento de biossensores eletroquímicos para fenol e uréia com foco na aplicação ambiental. **Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro**, p. 154, 2011.

SOUZA, Maria de Fátima Brito et al. Eletrodos quimicamente modificados aplicados à eletroanálise: uma breve abordagem. **Química nova**, v. 20, n. 2, p. 191-195, 1997.

SOUZA, Yasmin Chalfoun Pomárico et al. Diagnosis test for Visceral Leishmaniasis – presente and perspectives. **Rev. Cien. Elet. Med. Vet.** n 21, 2013.

SRIVASTAVA, Pankaj et al. Diagnosis of visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 105, n. 1, p. 1-6, 2011.

SUNDAR, Shyam; RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 9, n. 5, p. 951-958, 2002.



Article

Development of an Electrochemical Immunosensor for Specific Detection of Visceral Leishmaniasis Using Gold-Modified Screen-Printed Carbon Electrodes

Beatriz R. Martins¹, Yanne O. Barbosa¹, Cristhianne M. R. Andrade², Loren Q. Pereira², Guilherme F. Simão³, Carlo J. de Oliveira^{1,2}, Dalmo Correia², Robson T.S. Oliveira, Jr.¹, Marcos V. da Silva² , Anielle C. A. Silva⁴, Noelio O. Dantas⁴, Virmondes Rodrigues, Jr.^{1,2}, Rodrigo A. A. Muñoz ^{5,*} and Renata P. Alves-Balvedi ^{1,6,*}

¹ Institute of Biological and Natural Sciences, Federal University of Triângulo Mineiro, Uberaba-MG 38025-180, Brazil; biaroma_95@hotmail.com (B.R.M.); yanne.way@hotmail.com (Y.O.B.); carlo.oliveira@uftm.edu.br (C.J.d.O.); robson.junior@uftm.edu.br (R.T.S.O.J.); virmondes.rodrigues@uftm.edu.br (V.R.J.)

² Institute of Health Sciences, Federal University of Triângulo Mineiro, Uberaba-MG 38025-180, Brazil; cristhianne_m@hotmail.com (C.M.R.A.); lorenbiomedica@gmail.com (L.Q.P.); dalmo@mednet.com.br (D.C.); marcosuftm@gmail.com (M.V.d.S.)

³ Institute of Technological and Exact Sciences, Federal University of Triângulo Mineiro, Uberaba-MG 38025-180, Brazil; guilhermefelipesimao@gmail.com

⁴ Institute of Physics, Federal University of Alagoas, Maceio-AL 57072-970, Brazil; acalmeida@fis.ufal.br (A.C.A.S.); noelio@fis.ufal.br (N.O.D.)

⁵ Institute of Chemistry, Federal University of Uberlândia, Uberlândia-MG 38408-100, Brazil

⁶ Federal University of Triângulo Mineiro, Iturama-MG 38025-180, Brazil

*Correspondence: munoz@ufu.br (R.A.A.M.); renata.balvedi@uftm.edu.br (R.P.A.-B.)



Received: 16 June 2020; Accepted: 17 July 2020; Published: 23 July 2020 check for updates

Abstract: Visceral leishmaniasis is a reemerging neglected tropical disease with limitations for its diagnosis, including low concentration of antibodies in the serum of asymptomatic patients and cross-reactions. In this context, this work proposes an electrochemical immunosensor for the diagnosis of visceral leishmaniasis in a more sensitive way that is capable of avoiding cross-reaction with Chagas disease (CD). Crude *Leishmania infantum* antigens tested in the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) were methodologically standardized to best engage to the sensor. The antibodies anti-*Trypanosoma cruzi* and anti-*Leishmania* sp. Present in serum from patients with diverse types of CD or leishmaniasis were chosen. A screen-printed carbon electrode modified with gold nanoparticles was the best platform to guarantee effective adsorption of all antigens so that the epitope of specific recognition for leishmaniasis occurred efficiently and without cross-reaction with the evaluated CD. The current peaks reduced linearly after the recognition, and still were able to notice the discrimination between different kinds of diseases (digestive, cardiac, undetermined Chagas/acute and visceral chronic leishmaniasis). Comparative analyses with ELISA were performed with the same groups, and a low specificity (44%) was verified due to cross-reactions (high number of false positives) on ELISA tests, while the proposed immunosensor presented high selectivity and specificity (100%) without any false positives or false negatives for the serum samples from isolated patients with different types of CD and visceral leishmaniasis. Furthermore, the biosensor was stable for 5 days and presented a detection limit of 200 ng mL⁻¹.

Keywords: electrochemical biosensor; visceral leishmaniasis; Chagas disease; gold nanoparticles; point-of-care; portable analysis

1. Introduction

Leishmaniasis is a complex of diseases caused by a protozoan of the genus *Leishmania* [1,2] that affects millions of people worldwide. Visceral leishmaniasis, caused by *Leishmania donovani* and *Leishmania infantum*, represents the most severe form and can lead to death if not treated [3,4]. The onset of the infection and clinical manifestations are dependent on many factors including environmental and host immunologic status, especially in the early stages of infection [5]. Visceral leishmaniasis represents a major health problem in some tropical areas of the world. The currently available serum diagnosis does not fit the proper criteria of sensitivity and specificity, especially for identification of asymptomatic and/or low symptomatic patients due to the low concentration of antibodies in the serum, particularly in the case of asymptomatic patients, which results in high cross-reactions [6]. Furthermore, due to its epidemiological characteristics, a diagnostic test that is accessible in remote areas is a desired tool for precise diagnosis and early therapeutic intervention.

The diagnosis of visceral leishmaniasis is made by combining clinical signs with parasitological or serological tests; however, they depend on extremely equipped laboratories, qualified labor, and a long period of time to carry out the tests [7,8]. The parasitological diagnosis is the reference choice for exams for detecting the disease, which shows the parasite directly in tissues or in culture. Aspirates from the spleen, bone marrow, and lymph nodes are used, and liver biopsy can also be performed. These techniques have high specificity and variable sensitivity. Until 2014, the Ministry of Health used two tests: the fluorescence indirect antibody test (IFAT) for human leishmaniasis, developed by the Institute of Immunobiological Technology (Biomanguinhos), Fundação Oswaldo Cruz, Brazil, and the Kalazar Detect rapid test (InBios International, Seattle, WA, USA).

Several studies show a comparison between the techniques, such as rapid test rK39, direct agglutination test (DAT), and ELISA, with some even showing good sensitivities and specificities in these patients [9]. However, the identification of asymptomatic infection remains challenging, since it depends on the sensitivity and specificity of the employed technique [10]. Furthermore, there is no agreement among the available techniques, and thus it is necessary to search for the best method to measure visceral leishmaniasis positives not only in symptomatic patients [11]. Hence, the average linear range of asymptomatic patients is a concern.

In this context, the presentation of new methodologies that show good performance, easy handling, speed, and detection of asymptomatic patients is essential to the control and early treatment of leishmaniasis. In other words, the development of tools that contribute to the optimization of a portable platform of leishmaniasis is a priority. Thus, the development of electrochemical biosensors shows advantages in comparison to traditional techniques, such as fast execution, a small amount of sample utilization, portability, selectivity, and specificity to obtain diagnoses.

The physical principle of the biosensor is to turn the biological sign into an electrical sign, making it possible in this way to monitor and quantification of signals. The immobilization of antigens, which specifically recognize the antibodies, can be provided on the surface of the sensor. The biorecognition, in the case of the evaluated pathologies, involves the antibodies as the target of detection, and they can be also quantified [9,12].

Electrochemical biosensors were developed by some research groups seeking to solve the problem of diagnosis of visceral leishmaniasis, investigating novel platforms and modification procedures for the diagnostic needs of *Leishmania* sp. [13–23]. Amongst the platforms used in sensors, the carbon-based electrodes present conditions for immobilization (through adsorption) once they enable a random anchorage and orientation of the biomolecules on its surface. Meanwhile, gold electrodes enable oriented couplings that minimize the distance between the active biomolecule sites and the electrode surface, facilitating the electron transfer, and a greater number of antibodies can be immobilized on the electrode surface [24–26]. Considering the use of portable platforms for

point-of-care diagnosis, screen-printed electrodes play a key role in the development of electrochemical biosensors for several applications, as reported in the literature [27–35].

In order to an immunosensor functions properly for the diagnosis of leishmaniasis, it should be highly sensitive, specific, fast, and simple, with potential application for the serological diagnosis of leishmaniasis, since the disease is directly related to cross-reactivity with Chagas disease and other diseases. There are some studies reporting sensors for the diagnostic of *Leishmania* sp. Infection. Mohan et. al. [36] developed a genosensor modified with NiO nanostructured on an indium-tin oxide conductive glass plate to distinguish DNA from parasites extracted from human DNA extracts; however, these tests have not yet been performed in clinical samples. Moradi et al. [13] also developed a genosensor based on gold nanoparticles immobilized on polycrystalline gold discs and found high sensitivity in cutaneous leishmaniasis. However, the DNA extraction process has a higher cost compared to the use of protein antigens. Facing the diagnostic difficulties of cross-reactions, in this study, we describe how the electrode allows for differentiated interactions of the same biomolecule using a gold nanoparticle-modified surface, starting from the principle of this being biologically compatible and non-toxic. Such properties have attracted attention in diagnostic application because the molecules should not have their biological properties altered [26,36,37].

In this context, this work shows the development of an immunosensor for the specific diagnosis of visceral leishmaniasis without the cross-reactivity with Chagas disease (CD). Linear response, sensitivity, selectivity, specificity, repeatability, reproducibility, and stability were researched. To our knowledge, the concentration of *Leishmania* antigens considered as potential risk to develop the disease is not accurately known, and for this reason the proposed biosensor provides a detection limit in very concentrations (ng mL^{-1}) to detect antigens before the appearance of disease symptoms.

2. Materials and Methods

2.1. Reagents and Biomolecules

All used reagents were of analytical grade and were used without further purification. Ultrapure water (MilliQ, Resistivity value greater than $18.2 \text{ M}\Omega$, Millipore Corporation, Burlington, MA, USA) was used in the preparation of all solutions. The aqueous solution of the mixture of potassium ferricyanide/ferrocyanide ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$) in KCl (5 mmol L^{-1} , 0.1 mol L^{-1} , pH 7.4, LabSynth, Brazil) used for the electrochemical characterization of the immunosensor was prepared immediately before the use. Gold (III) chloride was dissolved in sulfuric acid medium ($1 \text{ g L}^{-1} \text{ AuCl}_3$ in 10 mL of 0.5 mol L^{-1} sulfuric acid). All experiments were carried out at controlled room temperature ($25 \pm 1^\circ \text{C}$).

Preparation of the leishmania infantum crude antigen: The PP75 strain of *Leishmania infantum* cultured in the Schneider medium, supplemented with 20% fetal bovine serum, in the exponential phase was centrifuged $2000\times g$ at 25°C for 20 min and then washed three times with phosphate buffer (PB) solution and discarded supernatant. The pellet was resuspended in PB containing 0.05% NP40 (Nonidet P-40 Substitute, Roche) with the COMPLETE protease inhibitor (ROCHE, SWI). The antigen was obtained by the method of freezing in liquid nitrogen and thawing in a 37°C water bath and then centrifuging it at $10,000\times g$ for 30 min, and then the supernatant containing the soluble crude antigen

was stored at -80°C until the moment of use. The protein concentration of the antigen was determined by the Lowry method [38]. Aliquots of the extract were stored with the total soluble antigens at -80°C

until further use. The preparation of crude antigens specific to *Leishmania infantum* was performed. This species is characteristic of visceral leishmaniasis [39]. The technique was performed and adapted on the basis of [40]. Moreover, in our experiments, the efficiency of soluble and membrane-free extract of the parasite (data not shown) was proven, since these *Leishmania infantum* antigens are able to specifically be recognized by the serum antibodies of patients with

visceral leishmaniasis antibodies. The real samples used in the experiments appeared favorable and were substantiated from CEP (Comitê de Ética em Pesquisa/Research Ethics Committee) by Plataforma Brasil. *Leishmania* sera have the CAAE 58301516.8.0000.5154 and were 1,846,584 in number. Chagas sera have the CAAE 64048117.3.0000.5154 and were 2,163,043 in number. The stock solutions of total antigens ($0.01 \mu\text{g mL}^{-1}$) and serum (visceral leishmaniasis = $1:100$ – 0.202 mg mL^{-1} ; CD = $1:100$ – 0.146 mg mL^{-1}) were diluted in deionized water and frozen until the electrochemical experiment. *Devices* Screen-printed carbon electrodes (DPR-110) and screen-printed gold electrodes (DPR-220 BT) were purchased from DropSens (Oviedo, Asturias, Spain), which consist of a ceramic strip containing a three-electrode system (working, counter, and reference electrodes) for a single-drop analysis. The reference was made of a silver ink (known as silver pseudo-reference electrode) and the counter and working electrodes were made of carbon ink (in DPR-110) or of made of a gold ink (in DPR-220 BT). The working electrode of the screen-printed carbon electrode was modified with gold by electrodeposition (next described), which is the third electrochemical device evaluated in this work. Electrochemical analyses were performed by cyclic voltammetry using Em Stat 1 equipment (PalmSens BV, The Netherlands) connected to a notebook. The changes in the electrochemical signals of $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ (5 mM) were evaluated (scan rate of 100 mV s^{-1}). For ELISA tests (EnSpire/PerkinElmer), optical density (OD) values were determined on a microtiter plate reader at 490 nm .

2.2. Indirect ELISA

The indirect ELISA for the detection of immunoglobulin G (IgG) antibodies against leishmania used high affinity plaques (Thermo Scientific Tm Nunc Tm, Waltham, MA, USA), which were sensitized with the antigens ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$), diluted in 0.06 mol L^{-1} carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.6), and incubated for 18 h at 4°C . After this period, all plates were washed six times with PB containing 0.05% Tween 20 (PB-T) and blocked with PB containing 5% skimmed milk powder (Molico, Nestle, São Paulo, Brazil—PB-M5%) for 4 h at room temperature. After further washing, the serum samples were 1:40 diluted in 5% PB-M and incubated for 2 hours at room temperature. After six washes, the anti-human IgG antibody (1:2000) conjugated to peroxidase (IgG/horseradish peroxidase (HRP), Dako) was added and incubated for 2 h at room temperature. After further washing, the reaction was developed by addition of the enzymatic substrate 1,2-orthophenylenediamine (OPD, Dako) with 0.05% H_2O_2 and stopped with H_3PO_4 . Positive and negative controls were included on the plate. The levels of antibodies were expressed in ELISA, according to the following formula: $\text{EI} = \text{Abs sample}/\text{cut-off}$, where cut-off is calculated as the mean of the Abs of negative control serum plus three standard deviations. EI values > 1.4 were considered positive.

2.3. Electrodeposition of Gold Nanoparticles on Carbon Electrodes

The electrodes were submitted to a 30-cycle cyclic voltammetry (CV) pre-treatment in $1 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$ solution in the potential range between -0.3 and $+1.2 \text{ V}$ at 100 mV s^{-1} for surface cleaning and activation. After that, the electrodes were submitted to the deposition of gold nanoparticles by 15 voltammetric cycles in a gold chloride (HauCl_4 , 1 g L^{-1}) solution prepared in $1 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$ in the potential range between 0.3 and $+1.0 \text{ V}$ at scan rate of 0.1 V s^{-1} [41–44]. After the electrodeposition, it is possible to verify the color change of the working electrode evidencing the formation of gold nanoparticles.

The activation of the modified electrode was performed by 10 cycles in $1 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$ solution to eliminate impurities that can hinder the adsorption of molecules, diminishing the reproducibility and stability of the modified surface [45–47].

2.4. Immunosensor

The first step involved the immobilization of the total soluble antigens on the surface of the working electrode (carbon, gold, and carbon modified with an electrodeposited gold nanoparticles)

by drop-casting. The dissolution method of 4 μL lasted until the solution dried (15 min). In order to prevent nonspecific binding, we added 4 μL of 1% bovine serum albumin (BSA) as a blocking solution (15 min) after the first step. At the end, the serum was made available until it dried. After each step, the electrodes were washed and dried in a desiccator. For the interaction investigation between total antigens immobilized on each working electrode and total soluble antigens recognition, we used the solution of $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ (5 mM) as a redox probe indicator. Thus, 80 μL of this solution was dropped over the three electrodes, closing the working electrode circuit between the other two electrodes (counter electrode and reference). Reactions occurred at room temperature ($25 \pm 1^\circ\text{C}$). Using the cyclic voltammetry (CV) technique, we evaluated the behavior of the electrochemical signal of the supporting electrolyte (indirect detection) on the sensor, as shown in Figure 1.

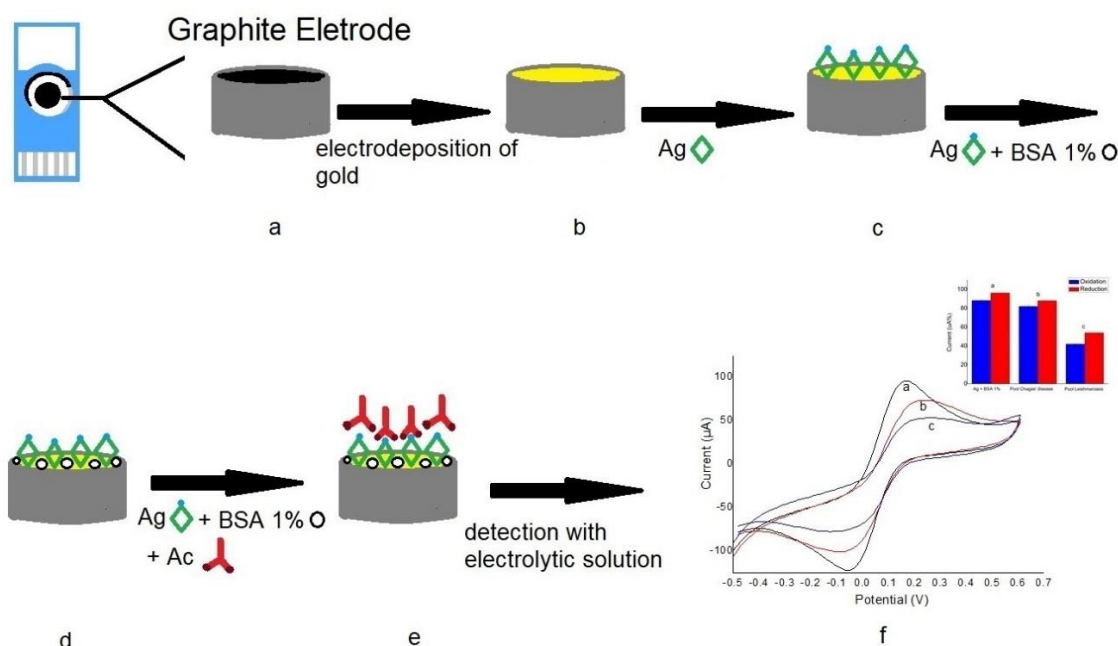


Figure 1. Scheme of the carbon immunosensor using a gold-modified electrode. The surface antigen probe was autonomized as presented in a voltammogram. The steps of preparation of the immunosensor are as follows: (a) the carbon electrode was selected as the base platform; (b) carbon was electrodeposited with gold nanoparticles; (c) the *Leishmania infantum* antigen was immobilized on the gold nanoparticle-modified surface; (d) the 1% bovine serum albumin (BSA) blocking solution was coupled to the platform as a blocking solution; (e) after the preparations, the antibodies were coupled (real sample/serum); and (f) at the end, the electroanalytical solution was inserted and the process of transduction was initiated.

2.5. Specificity

An aliquot of 4 μL of positive serum for Chagas disease (1:100 diluted) was pipetted on the immunosensor and kept for 15 min at room temperature. Thereafter, a final wash occurred with MilliQ water (50 μL), and the electrode was dried. Using the other electrode, the same protocol with positive serum for leishmaniasis (1:100 diluted) was performed, and on a third electrode, it was performed with serum negative (diluted 1:100, protein concentration in $5 \mu\text{g mL}^{-1}$). In all tests, including triplicates, the changes in the electrochemical signals of $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ (5 mM) were evaluated (scan rate: 100 mV s^{-1}).

2.6. Sensor Stability

To evaluate the stability of the immunosensor, we stored modified electrodes containing the total soluble antigen at 4°C for 5 days, protecting them from light and oxygen.

2.7. Calibration Curve

To validate the immunosensor sensitivity analyses, we added 4 μL of different serum dilutions (1:25, 1:50, 1:100, 1:250, 1:100,000) to the immunosensor. Incubation was for 15 min at 25 ± 1 °C.

2.8. Statistical Analysis

The analyses are descriptive and are based on the comparative study of the voltammograms and their reinterpretations in bar charts and linear graphs (calibration).

3. Results and Discussion

3.1. Screen-Printed Electrode

Considering the differential molecular interaction with electrodes, we proposed the evaluation of the antigens and their recognition by anti-*Leishmania* antibodies present in the serum using a screen-printed carbon electrode and a screen-printed gold electrode (results shown in Figure 2A,B). It is important to emphasize that the same antibody/antigen system was used in the proposed electrochemical biosensor. The analyses enabled the evaluation of which platform increased stability and maintenance of the biological activity of the antibody because the immobilization of the probe on the electrode surface is a crucial step in the development of the sensors. To homogenize the analyses, we assembled the column graphs from current peak data, extracted from CV measurements. The current percentages (oxidation and reduction currents of the redox probe) were calculated from the initial CV (without the biomolecule) counting 100%. As the immobilization of biomolecules occurs by physical adsorption, conducting sites of the working electrode are blocked and therefore a fall of the current occurs (fewer conducting sites are available for the redox probe undergoes the electron transfer). Thus, low percentage refers to high blocking surface due to proportional immobilization or molecular recognition (Figure 2). On carbon (Figure 2A), an affinity for adsorption of antigens was shown, but no recognition for antibodies present in serum from patients with CD and visceral leishmaniasis was found, which indicates the effect of cross-reactivity. On the other hand, when the gold electrode was used as a platform (Figure 2B), a greater affinity for CD occurred more effectively in comparison with visceral leishmaniasis. This result may be explained by the molecular organization of the antigens on the gold surface due to thiol group presented in the leishmaniasis antigens, as previously stated in the literature for the immobilization of visceral leishmaniasis antigens [48].

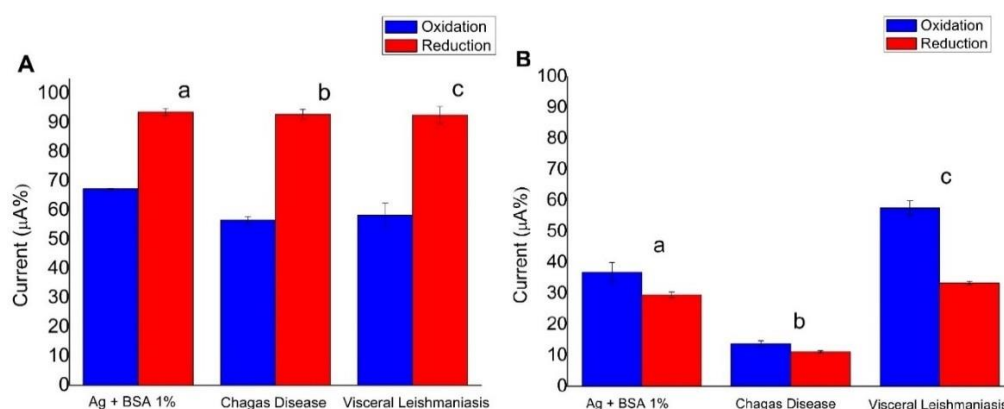


Figure 2. Column graphs extracted from cyclic voltammetry (CV) shows the variation of current peak percentages for (a) after immobilization of total soluble antigen followed by the addition of BSA, (b) after addition of Chagas disease (CD) antibodies, and (c) after addition of visceral leishmaniasis antibodies. The percentages were calculated from initial CV (without biomolecule) counting 100%. Screen-printed carbon electrode used as a platform. (B) Screen-printed gold electrode used as a platform. The data are oxidation in

blue and reduction in red. The electrochemical probe was $5 \text{ mmol L}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ and scan rate was 100 mV s^{-1} .

3.2. Gold-Modified Electrode Used as a Platform

Preliminary results using the screen-printed gold electrodes showed higher sensitivity than the screen-printed carbon electrodes; however, the results were not completely satisfactory when the immunosensor was evaluated in real samples (sensitivity was still moderate), and for this reason we investigated a novel platform—the gold-modified screen-printed carbon electrodes. This platform is well known for the formation of gold nanoparticles by electrodeposition [41], and thus the working electrode of the screen-printed carbon electrode strip was used as the electrode surface for modification. The modification with gold nanoparticles provided an increase in surface area and hence could potentially improve sensitivity. Figure 3A shows the CV recordings and the respective current percentages (bar plot beside the CVs) after the addition of (a) antigens, (b) CD, and (c) visceral leishmaniasis. This figure shows that the affinity for adsorption of antigens was effective and even more effective for the recognition of anti-leishmania antibodies than using the gold electrode because the current values of the redox probe decreased sequentially in (b) and (c). We can note the absence of cross-reactivity with Chagasic serum, proving the specificity of this sensor (Figure 3A). Moreover, on the basis of the higher efficiency of antigen immobilization without affecting its biorecognition site, we selected carbon electrodes modified with electrodeposited gold nanoparticles. Figure 3A also shows that the total soluble antigens could quantitatively discriminate (b) and (c) from each serum (CH 146, LSH 202). Figure 3B shows the response in the presence of groups of different clinical forms of Chagas diseases. Even under these conditions, the immunosensor responded only to anti-*Leishmania* antibodies, which indicated the absence of cross-reactivity. Figure 3C shows changes in current peaks from the different types of leishmaniasis, indicating the recognition of the immunosensor towards the different leishmaniasis antibodies.

3.3. Stability

The stability studies of the biosensor were evaluated under storage at 4°C for 5 days, protected from light and oxygen. This experiment was performed with the same electrode previously optimized using a gold-modified screen-printed carbon electrode modified with leishmaniasis antigens. The biosensor was evaluated in the presence of anti-*Leishmania* antibodies and we observed a decrease of 46% in the detection capacity after 5 days. This signal decrease indicated lack of stability, which is a compromising feature of the proposed biosensor. Future experiments are required to investigate a condition to improve the stability of the immunosensor.

3.4. Calibration Curve

Figure 4 shows the preliminary analysis of the calibration curve using the immunosensor. Keeping in mind that the current of the redox probe is inversely proportional to the concentration of antibodies, we used diluted serum at 1:25, 1:50, 1:100, 1:250, and 1:100,000 ratios. Higher dilutions did not generate linearity on the results (tests performed in triplicates). This plot presents the correlation coefficient of 0.9746 (for the equation: $i(\%) = -727.5 \times [\text{serum dilution ratio}] + 72.83$), an estimated limit of detection of 202 ng mL^{-1} , and limit of quantification of 606 ng mL^{-1} . The inset shows the equation obtained from the linear regression of a current peak (%) vs. concentration of leishmaniasis.

In the screen-printed electrodes without alteration of their surfaces (carbon surface), it was possible to observe that there was reactivity and absence of specification. The choice of electrodeposition of gold nanoparticles provided to the carbon electrode new physical-chemical properties of the biomolecules that were immobilized on its surface. The results demonstrated that the electrodeposition of the gold nanoparticles was not only capable of promoting reactivity, but also the desired selectivity. In addition to improving the responses on biosensor platforms, it also allowed the interaction of the biological probes to the surface of the same ones [49]. Given the

results, the electrodeposited gold on the screen-printed carbon electrode improved the sensitivity of the sensor by effectively increasing the surface area of the electrode, promoting a greater site of adsorption of total soluble antigens [50]. Moreover, the orientation of the total soluble antigen adsorption on gold nanoparticles may have contributed to the improved specificity not obtained when the total soluble antigens were immobilized on the unmodified carbon electrode. The interaction and orientation of total soluble antigens may occur through the S-H bonds of some amino acids of the total soluble antigens, knowing that these were strongly linked to gold (chemisorption/covalent) [51,52]. This combination generates a laterally organized system between the biomolecules in a spontaneous, stabilized, and oriented way, being well-known as a self-assembled monolayer [48]. This kind of modification has extra experimental advantages over the use of gold in biosensors. Furthermore, it is linked to ease of handling and preparation, low cost, accessibility, and stability without the need for an additional step involving the addition of a thiol monolayer on the electrode surface [53,54].

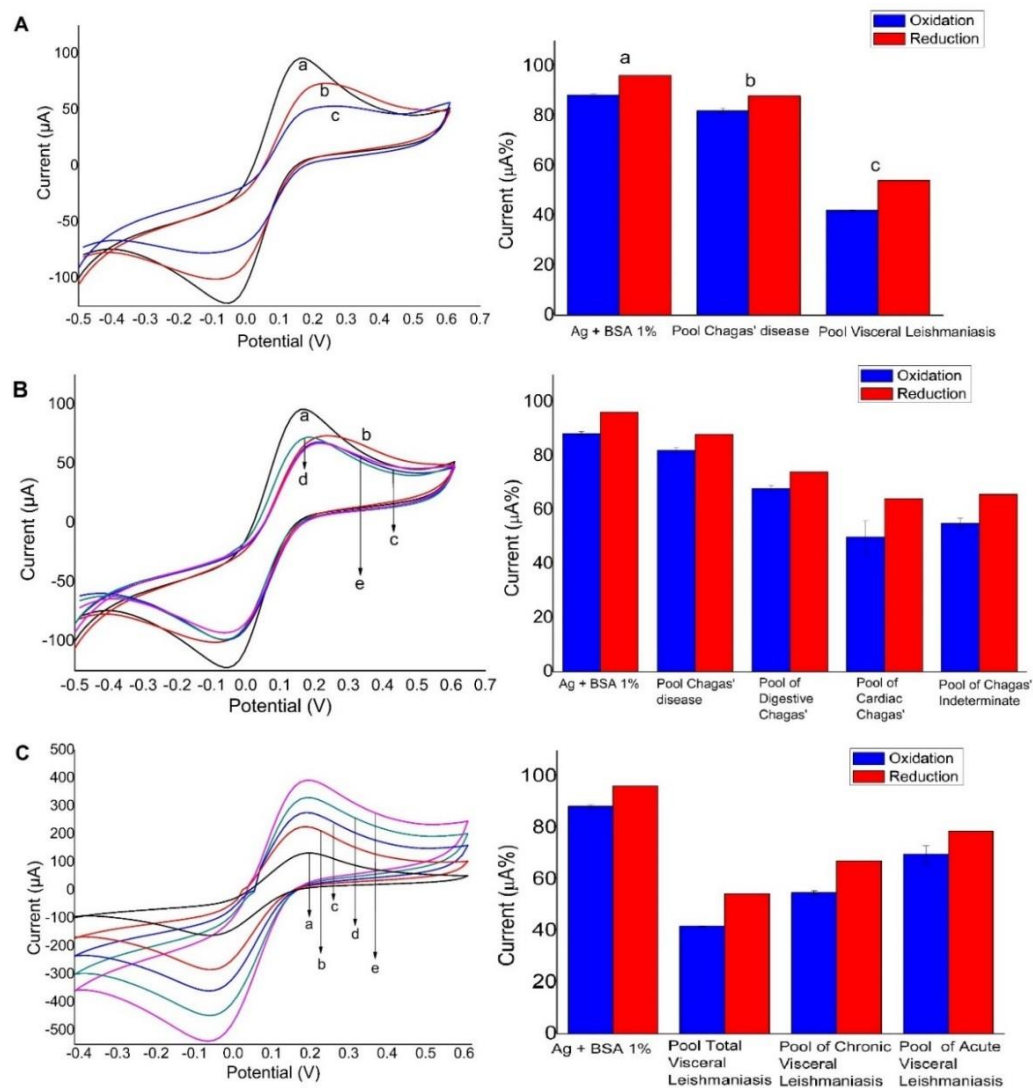


Figure 3. Cyclic voltammograms for the redox probe on the carbon electrode modified with gold nanoparticles that were electrodeposited and antigens; bar plots show the variation of peak current percentages. (A) Immunosensor (a), pool Chagas serum (b), pool visceral leishmaniarum (c). Immunosensor (a) and different clinical forms by CD: Chagas serum pool (b), cardiac Chagas serum (c), digestive Chagas serum (d), Chagas undetermined serum (e). (C) Pool of total visceral leishmaniasis (a), pool of acute visceral leishmaniasis (b), pool of chronic visceral leishmaniasis (c), antigen *Leishmania infantum* + BSA1% (d),

pool negative for leishmaniasis (e). The changes in the electrochemical signals of $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ (5 mM) were evaluated (scan rate of 100 mV s^{-1}).

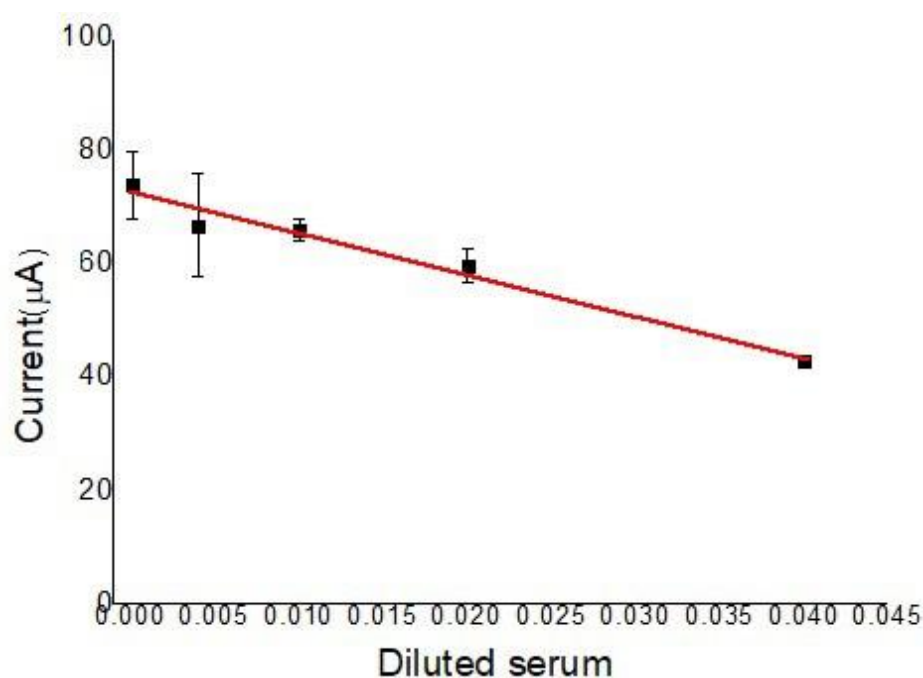


Figure 4. Calibration curve obtained from current peak percentages for triplicate measurements of the biosensors in the presence of diluted serum (1:25, 1:50, 1:100, 1:250, and 1:100,000) containing antibodies (stock serum solution of 20.2 mg mL^{-1}). The percentages were calculated from initial CV (without biomolecule) counting 100%. The changes in the electrochemical signals of $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ (5 mM) were evaluated (scan rate of 100 mV s^{-1}).

3.5. Comparison with Indirect ELISA

In this study, a comparison of the results of the electrochemical immunosensor with indirect ELISA was carried out. The different diagnostic methods of visceral leishmaniasis present detection difficulties justified by the occurrence of cross-reactions with other trypanosomatids, explained by phylogenetic limitations existing among protozoa [1]. The results for indirect ELISA indicate low specificity (Table S1 shows the representation values from the ELISA plate tests shown in Figure S1). As expected, the cross-reaction occurred, with discrimination only in positive serum from patients with acute leishmaniasis (Figure S1). The lack of specificity that occurred in the ELISA test can be explained by the occurrence of affinities between the total antigen of visceral leishmaniasis and the antibody of Chagas disease. Figure 5A shows the distribution of ELISA index (EI) values obtained for the tests performed in different serum samples (data from Table S1), with the individual tests showing cross-reaction. From the distribution in Figure 5A, it is possible to observe 1 false negative and 15 false positive tests. Figure 5B shows the EI values and percentage current obtained by the proposed immunosensor obtained for the same serum samples (six different diseases and a pool of all of them). We found that the proposed biosensor detects Chagas disease as being a weak interaction, with this connection being due to the existence of some possible interactions between the total leishmaniasis antigen and the anti-*Trypanosoma cruzi* antibody that causes Chagas disease. In the detection of leishmaniasis, there is a strong interaction between the total visceral leishmaniasis antigen and the anti-*Leishmania infantum* antibody, a result that converges with what is expected in theory. While the electrochemical immunosensor was able to discriminate acute and chronic leishmaniasis from all the analyzed serum samples, the ELISA test showed values of EI higher than 1.4 for almost all cases presented in Figure 5B, which indicates false negative for cardiac, digestive, and

indeterminate Chagas. Thus, the electrochemical biosensor can differentiate diseases, even with the occurrence of such affinities reported in the literature.

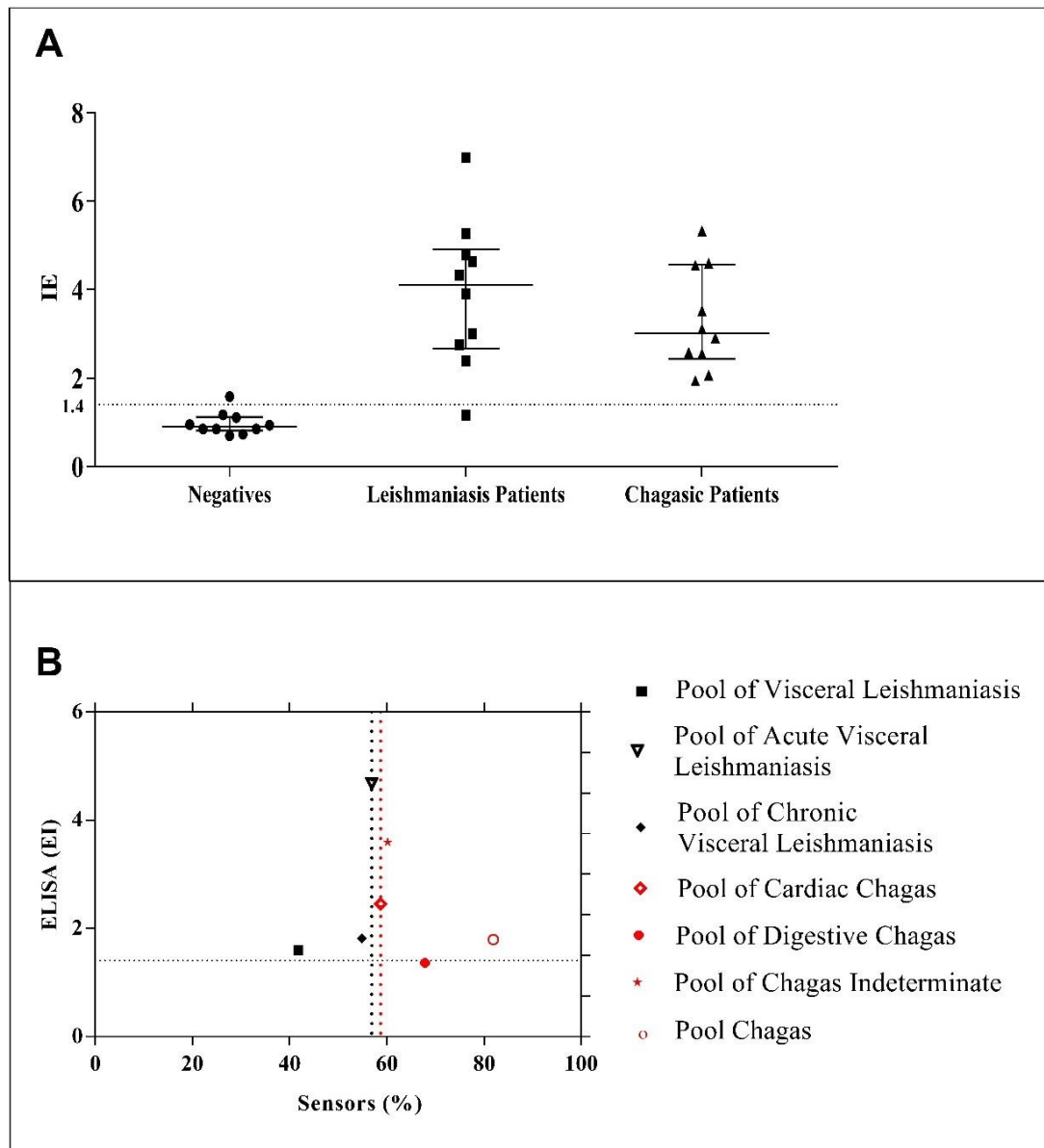


Figure 5. (A) Distribution of ELISA index (EI) values obtained by indirect ELISA (data from Table S1), with a line at EI = 1.4 to guide the reader (values above 1.4 are considered positive for the tests), for serum samples from patients with different types of diseases. (B) EI values (ELISA) and percentage current (proposed immunosensor) obtained for the same serum samples of different diseases (acute and chronic visceral leishmaniasis; cardiac, digestive, and indeterminate Chagas; and a pool of all). Current values below the black dotted line indicate positive tests for leishmaniasis, while current values above the red dotted line indicate negative tests.

On the basis of these results, we calculated the selectivity and specificity parameters for the electrochemical biosensor and ELISA using the following equations [55,56]:

$$(\text{Specificity}) = (\text{total of negative tests}) / (\text{false positives} + \text{total negative tests}) (1)$$

$$(\text{Sensitivity}) = (\text{total of positive tests}) / (\text{false negatives} + \text{total positive tests}) (2)$$

ELISA tests presented low specificity (44%) for a total of 38 serum samples analyzed due to the high

number of false positives (15). Selectivity was calculated as 93.2% due to one false negative test.

On the other hand, the proposed electrochemical biosensor did not present any false positive or false negative for the total of 12 analysis of serum samples from patients of different types of CD and leishmaniasis, and consequently the calculated specificity and sensitivity values were both 100%. Therefore, the developed immunosensor presented impressive advantages over the current ELISA tests for the diagnosis of *Leishmania infantum*.

Finally, Table 1 compares the sensitivity and specificity of the proposed electrochemical biosensor and ELISA tests with data referring to the diagnostic tests of existing leishmaniasis. This table shows that the proposed biosensor presents the highest sensitivity and specificity values compared to traditional ELISA tests, as well as other diagnostic tests.

Table 1. Results of research conducted on patients with the aim of finding an efficient diagnosis of leishmaniasis.

Method	Material	Sensitivity/Specificity	Reference
IFAT	Serum	88–92%/83–88%	[57]
Kalazar Detect	Serum	84–88.1%/91%	[57]
IT LEISHBio-Rad	Blood/Serum	92–93%/92–98%	[57]
PCR	Blood	93%/96%	[8,57,58]
DAT-LPC	Blood	99%/98%	[57]
RIFI	Serum	0–100%/80%	[9,10]
Immunochromatographic tests	Serum	87%/94%	[11–13]
ELISA	Serum	80–99%/81–100%	[14–18]
Electrochemical	DNA extracted of blood	Not explained	[22]
ELISA	Serum	92.3%/44%	This work
Electrochemical	Serum	100%/100%	This work

4. Conclusions

The results showed that the electrodeposition of gold nanoparticles on the carbon electrode was efficient in immobilization of the antigens, providing better results than bare carbon electrode or gold electrode. This property allowed specific epitope recognition of antibodies present in serum from patients with visceral leishmaniasis. It should be noted that the use of serum from patients with CD solves a major problem in detection tests present in the market. We aim to improve and develop these sensors for application in public health, that is, in a large number of tests with high performance in sensitivity and specificity. Therefore, future studies will be extended in the selection of antigens purified for the diagnosis of asymptomatic visceral leishmaniasis patients and tests with extended periods in stability. In this way, such a tool may be feasible for practical applications and commercial purposes, with a reduced cost compared with Western blot, and improved performance in comparison with ELISA. Hence, electrochemical immunosensors offer great promises for specific and selective diagnosis of visceral leishmaniasis.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2079-6374/10/8/81/s1>, Figure S1: ELISA plates for immunological tests. Table S1: Values of ELISA index (IE) obtained for all samples. Values above 1.4 are considered positive for the tests.

Author Contributions: Conceptualization, V.R.J., R.A.A.M., R.P.A.-B.; methodology/resources, C.J.d.O., D.C., R.T.S.O.J., M.V.d.S., A.C.A.S., N.O.D., V.R.J., R.A.A.M., R.P.A.-B.; validation/formal analysis/investigation, B.R.M.Y.O.B., C.M.R.A., L.Q.P., G.F.S.; data curation, C.J.d.O., D.C., R.T.S.O.J., M.V.d.S., A.C.A.S., N.O.D., V.R.J., R.A.A.M., R.P.A.-B.; writing—original draft preparation, R.P.A.-B.; writing—review and editing, R.A.A.M., R.P.A.-B.; visualization, R.A.A.M., R.P.A.-B.; supervision, R.A.A.M., R.P.A.-B.; project administration, R.P.A.-B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Research Foundation of the State of Minas Gerais (FAPEMIG, APQ-01083-16), the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, 465389/2014-7 INCTBio), the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES, financial code 001).

Acknowledgments: We are grateful to Pro-Rector for Research and Post-Graduation of UFTM and the Graduate Programs in Physiological Sciences (PPGCF) and in Tropical Medicine and Infectiology (PPGMEDTROP) of UFTM. We would also like to thank Luiz Fernando de Oliveira for the English grammar review of the manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Convit, J.; Ulrich, M.; Fernandez, C.T.; Tapia, F.J.; Caceres-Dittmar, G.; Castes, M.; Rondon, A.J. The clinical and immunological spectrum of American cutaneous leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1993**, *87*, 444–448. [CrossRef]
2. Castellano, L.R.; Correia-Filho, D.; Agiro, L.; Dessein, H.; Prata, A.; Dessein, A.; Rodrigues, V. Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis and clinical cure is associated with strong interferon- γ production. *Hum. Immunol.* **2009**, *70*, 383–390. [CrossRef] [PubMed]
3. Pérez-Cabeza, B.; Cecílio, P.; Robalo, A.L.; Silvestre, R.; Carrilho, E.; Moreno, J.; San Martín, J.V.; Vasconcellos, R.; Cordeiro-da-Silva, A. Interleukin-27 Early Impacts Leishmania infantum Infection in Mice and Correlates with Active Visceral Disease in Humans. *Front Immunol.* **2016**, *7*, 478. [CrossRef] [PubMed]
4. Gutiérrez-Rebolledo, G.A.; Drier-Jonas, S.; Jiménez-Arellanes, M.A. Natural compounds and extracts from Mexican medicinal plants with anti-leishmaniasis activity: An update. *Asian Pac. J. Trop. Med.* **2017**, *10*, 1105–1110. [CrossRef]
5. Gollob, K.J.; Viana, A.G.; Dutra, W.O. Immunoregulation in human American leishmaniasis: Balancing pathology and protection. *Parasite Immunol.* **2014**, *36*, 367–376. [CrossRef]
6. Matos, H.J.d.; Pinto, A.Y.d.N.; Miranda, A.M.M.; Silva, F.L.C.; Ramos, F.L.P. Cross-reactivity in serological tests between Chagas disease and visceral leishmaniasis in endemic regions for both diseases. *Rev. Pan-Amaz. Saúde* **2015**, *6*, 65–68. [CrossRef]
7. Pan American Health Organization, Key facts on Neglected Infectious Diseases. Leishmaniasis. 2017. Available online: <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2017/2017-cha-leishmaniasis-factsheet-work.pdf> (accessed on 12 June 2020).
8. Freire, M.L.; Machado de Assis, T.; Oliveira, E.; Moreira de Avelar, D.; Siqueira, I.C.; Barral, A.; Rabello, A.; Cota, G. Performance of serological tests available in Brazil for the diagnosis of human visceral leishmaniasis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2019**, *13*, e0007484. [CrossRef]
9. Lemos, A.J.G.; Balvedi, R.P.A.; Rodovalho, V.R.; Resende, L.O.; Castro, A.C.H.; Cuadros-Orellana, S.; Madurro, J.M.; Brito-Madurro, A.G. Immunosensor assembled on polymeric nanostructures for clinical diagnosis of C-reactive protein. *Microchem. J.* **2017**, *133*, 572–576. [CrossRef]
10. Pereira, S.V.; Bertolino, F.A.; Fernández-Baldo, M.A.; Messina, G.A.; Salinas, E.; Sanz, M.I.; Raba, J. A microfluidic device based on a screen-printed carbon electrode with electrodeposited gold nanoparticles for the detection of IgG anti-Trypanosoma cruzi antibodies. *Analyst* **2011**, *136*, 4745–4751. [CrossRef]
11. Moreno, E.C.; Gonçalves, A.V.; Chaves, A.V.; Melo, M.N.; Lambertucci, J.R.; Andrade, A.S.R.; Negrão-Corrêa, D.; Antunes, C.M.D.F.; Carneiro, M. Inaccuracy of enzyme-linked immunosorbent assay using soluble and recombinant antigens to detect asymptomatic infection by Leishmania infantum. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2009**, *3*, 1–7. [CrossRef]
12. Balvedi, R.P.A.; Castro, A.C.H.; Madurro, J.M.; Brito-Madurro, A.G. Detection of a specific biomarker for Epstein-Barr virus using a polymer-based genosensor. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15*, 9051–9066. [CrossRef] [PubMed]
13. Moradi, M.; Sattarahmady, N.; Rahi, A.; Hatam, G.R.; Sorkhabadi, S.M.R.; Heli, H. A label-free, PCR-free and signal-on electrochemical DNA biosensor for Leishmania major based on gold nanoleaves. *Talanta* **2016**, *161*, 48–53. [CrossRef] [PubMed]
14. Sakkas, H.; Gartzonika, C.; Levidiotou, S. Laboratory diagnosis of human visceral leishmaniasis. *J. Vector Borne Dis.* **2016**, *53*, 8–16. [PubMed]
15. Luciano, R.M.; Lucheis, S.B.; Troncarelli, M.Z.; Luciano, D.M.; Langoni, H. Leishmania sp. And Trypanosoma cruzi antigen cross reaction evaluation in dogs by indirect immunofluorescence diagnosis (RIIF). *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* **2009**, *46*, 181–187. [CrossRef]
16. Burns, J.M.; Shreffler, W.G.; Benson, D.R.; Ghalib, H.W.; Badaro, R.; Reed, S.G. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of Leishmania Chagasic that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 775–779. [CrossRef] [PubMed]

17. Maia, Z.; Lírio, M.; Mistro, S.; Mendes, C.M.C.; Mehta, S.R.; Badaro, R. Comparative study of rK39 Leishmania antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis: Systematic review with meta-analysis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2012**, *6*, e1484. [[CrossRef](#)]
18. Saghrouni, F.; Gaïed-Meksi, S.; Fathallah, A.; Amri, F.; Ach, H.; Guizani, I.; Saïd, M. Ben Immunochromatographic rK39 strip test in the serodiagnosis of visceral leishmaniasis in Tunisia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2009**, *103*, 1273–1278. [[CrossRef](#)]
19. Segatto, M.; Ribeiro, L.S.; Costa, D.L.; Costa, C.H.N.; de Oliveira, M.R.; Carvalho, S.F.G.; Macedo, A.M.; Valadares, H.M.S.; Dietze, R.; de Brito, C.F.A.; et al. Genetic diversity of Leishmania infantum field populations from Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2012**, *107*, 39–47. [[CrossRef](#)]
20. Arraes, S.M.A.A.; Marini, M.T.; Martello, D.; Silveira, T.G.V.; Lonardoni, M.V.C.; Nanni, M.R. Serological investigation of subclinical cutaneous leishmaniasis cases following an outbreak in an endemic area. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **2008**, *41*, 205–208. [[CrossRef](#)]
21. Sato, C.M.; Sanchez, M.C.A.; Celeste, B.J.; Duthie, M.S.; Guderian, J.; Reed, S.G.; De Brito, M.E.F.; Campos, M.B.; De Souza Encarnação, H.V.; Guerra, J.; et al. Use of recombinant antigens for sensitive serodiagnosis of American tegumentary leishmaniasis caused by different leishmania species. *J. Clin. Microbiol.* **2017**, *55*, 495–503. [[CrossRef](#)]
22. Ferreira, M.P.; Roselino, A.M.F.; Nascimento, M.M.P.; Machado Aires, J.; Figueiredo, J.F.C. Sensitivity of an immunoenzymatic test for the detection of anti-l. braziliensis antibodies compared to other tests used for the diagnosis of american cutaneous leishmaniasis. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* **2006**, *48*, 1–3. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Laurenti, M. Correlation between parasitological and serological diagnosis in canine american visceral leishmaniasis. *BEPA Bol. Epidemiológico Paul.* **2009**, *6*, 13–23.
24. Pereira, A.C.; Santos, A.D.S.; Kubota, L.T. Trends in amperometrics electrodes modification for electroanalytical applications. *Quim. Nova* **2002**, *25*, 1012–1021.
25. Freire, R.S.; Pessoa, C.A.; Kubota, L.T. Self-assembled monolayers applications for the development of electrochemical sensors. *Quim. Nova* **2003**, *26*, 381–389. [[CrossRef](#)]
26. Fonseca, R.A.S.; Ramos-Jesus, J.; Kubota, L.T.; Dutra, R.F. A nanostructured piezoelectric immunosensor for detection of human cardiac troponin T. *Sensors* **2011**, *11*, 10785–10797. [[CrossRef](#)]
27. Pérez-Fernández, B.; Costa-García, A.; Muñiz, A.D.L.E. Electrochemical (Bio)Sensors for Pesticides Detection Using Screen-Printed Electrodes. *Biosensors* **2020**, *10*, 32–58.
28. Shkodra, B.; Demelash Abera, B.; Cantarella, G.; Douaki, A.; Avancini, E.; Petti, L.; Lugli, P. Flexible and Printed Electrochemical Immunosensor Coated with Oxygen Plasma Treated SWCNTs for Histamine Detection. *Biosensors* **2020**, *10*, 35. [[CrossRef](#)]
29. Cancelliere, R.; Carbone, K.; Pagano, M.; Cacciotti, I.; Micheli, L. Biochar from brewers' spent grain: A green and low-cost smart material to modify screen-printed electrodes. *Biosensors* **2019**, *9*, 139. [[CrossRef](#)]
30. Chiticaru, E.A.; Pilan, L.; Damian, C.M.; Vasile, E.; Burns, J.S.; Ionita, M. Influence of graphene oxide concentration when fabricating an electrochemical biosensor for DNA detection. *Biosensors* **2019**, *9*, 113. [[CrossRef](#)]
31. Martínez-García, G.; Pérez-Julián, E.; Agüí, L.; Cabré, N.; Joven, J.; Yáñez-Sedeño, P.; Pingarrón, J.M. An electrochemical enzyme biosensor for 3-hydroxybutyrate detection using screen-printed electrodes modified by reduced graphene oxide and thionine. *Biosensors* **2017**, *7*, 50. [[CrossRef](#)]
32. Ahmad, N.M.; Abdullah, J.; Yusof, N.A.; Ab Rashid, A.H.; Rahman, S.A.; Hasan, M.R. Amperometric biosensor based on zirconium oxide/polyethylene glycol/tyrosinase composite film for the detection of phenolic compounds. *Biosensors* **2016**, *6*, 31. [[CrossRef](#)]
33. Badalyan, A.; Dierich, M.; Stiba, K.; Schwuchow, V.; Leimkühler, S.; Wollenberger, U. Electrical wiring of the aldehyde oxidoreductase PaoABC with a polymer containing osmium redox centers: Biosensors for benzaldehyde and GABA. *Biosensors* **2014**, *4*, 403–421. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Settingington, E.B.; Alocilja, E.C. Electrochemical biosensor for rapid and sensitive detection of magnetically extracted bacterial pathogens. *Biosensors* **2012**, *2*, 15–31. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Rama, E.C.; Costa-García, A. Screen-printed Electrochemical Immunosensors for the Detection of Cancer and Cardiovascular Biomarkers. *Electroanalysis* **2016**, *28*, 1700–1715. [[CrossRef](#)]
36. Mohan, S.; Srivastava, P.; Maheshwari, S.N.; Sundar, S.; Prakash, R. Nano-structured nickel oxide-based DNA biosensor for detection of visceral leishmaniasis (Kala-azar). *Analyst* **2011**, *136*, 2845–2851. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Sharma, A.; Matharu, Z.; Sumana, G.; Solanki, P.R.; Kim, C.G.; Malhotra, B.D. Antibody immobilized cysteamine functionalized-gold nanoparticles for aflatoxin detection. *Thin Solid Film.* **2010**, *519*, 1213–1218. [[CrossRef](#)]
38. Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **1951**, *193*, 265–275.
39. Gontijo, C.M.F.; Melo, M.N. Visceral Leishmaniasis in Brazil: Current status, challenges, and prospects. *Rev. Bras.*

- Epidemiol.* **2004**, *7*, 338–349. [[CrossRef](#)]
40. Scott, P.; Pearce, E.; Natovitz, P.; Sher, A. Vaccination against cutaneous leishmaniasis in a murine model. I. Induction of protective immunity with a soluble extract of promastigotes. *J. Immunol.* **1987**, *139*, 221–227.
 41. Dai, X.; Nekraseova, O.; Hyde, M.E.; Compton, R.G. Anodic stripping voltammetry of arsenic (III) using gold nanoparticle-modified electrodes. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 5924–5929. [[CrossRef](#)]
 42. Chikae, M.; Fukuda, T.; Kerman, K.; Idegami, K.; Miura, Y.; Tamiya, E. Amyloid- β detection with saccharide immobilized gold nanoparticle on carbon electrode. *Bioelectrochemistry* **2008**, *74*, 118–123. [[CrossRef](#)]
 43. Regiart, M.; Pereira, S.V.; Bertolino, F.A.; Garcia, C.D.; Raba, J.; Aranda, P.R. An electrochemical immunosensor for anti-T. cruzi IgM antibodies, a biomarker for congenital Chagas disease, using a screen-printed electrode modified with gold nanoparticles and functionalized with shed acute phase antigen. *Microchim. Acta* **2016**, *183*, 1203–1210. [[CrossRef](#)]
 44. Bollella, P.; Gorton, L.; Ludwig, R.; Antiochia, R. A third-generation glucose biosensor based on cellobiose dehydrogenase immobilized on a glassy carbon electrode decorated with electrodeposited gold nanoparticles: Characterization and application in human saliva. *Sensors* **2017**, *17*, 1912. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 45. Almeida, E.S.; Richter, E.M.; Munoz, R.A.A. On-site fuel electroanalysis: Determination of lead, copper and mercury in fuel bioethanol by anodic stripping voltammetry using screen-printed gold electrodes. *Anal. Chim. Acta* **2014**, *837*, 38–43. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 46. Da Silva, S.M.; Squizzato, A.L.; Rocha, D.P.; Vasconcellos, M.L.S.; Ferreira, R.D.; Richter, E.M.; Munoz, R.A.A. Improved anodic stripping voltammetric detection of zinc on a disposable screen-printed gold electrode. *Ionics* **2020**, *26*, 2611–2621. [[CrossRef](#)]
 47. Vasconcellos, M.L.S.; Rocha, D.P.; Castro, S.V.F.; Silva, L.R.G.; Munoz, R.A.A.; Freitas, M.B.J.G.; Ferreira, R.Q. Electroanalytical Method for Determination of Trace Metals in Struvite Using Electrochemically Treated Screen-Printed Gold Electrodes. *J. Braz. Chem. Soc.* **2020**, *31*, 1873–1882. [[CrossRef](#)]
 48. Cordeiro, T.A.R.; Gonçalves, M.V.C.; Franco, D.L.; Reis, A.B.; Martins, H.R.; Ferreira, L.F. Label-free electrochemical impedance immunosensor based on modified screen-printed gold electrodes for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Talanta* **2019**, *195*, 327–332. [[CrossRef](#)]
 49. Janegitz, B.C.; Medeiros, R.A.; Rocha-Filho, R.C.; Fatibello-Filho, O. Direct electrochemistry of tyrosinase and biosensing for phenol based on gold nanoparticles electrodeposited on a boron-doped diamond electrode. *Diam. Relat. Mater.* **2012**, *25*, 128–133. [[CrossRef](#)]
 50. Chu, X.; Zhao, Z.L.; Shen, G.L.; Yu, R.Q. Quartz crystal microbalance immunoassay with dendritic amplification using colloidal gold immunocomplex. *Sens. Actuators B Chem.* **2006**, *114*, 696–704. [[CrossRef](#)]
 51. Godínez, L.A. Substratos modificados con monocapas autoensambladas: Dispositivos para fabricar sensores y estudiar procesos químicos y fisicoquímicos interfaciales. *J. Mex. Chem. Soc.* **1999**, *43*, 219–229.
 52. Galal, A.; Atta, N.F.; El-Ads, E.H. Probing cysteine self-assembled monolayers over gold nanoparticles-Towards selective electrochemical sensors. *Talanta* **2012**, *93*, 264–273. [[PubMed](#)]
 53. Chaki, N.K.; Vijayamohanan, K. Self-assembled monolayers as a tunable platform for biosensor applications. *Biosens. Bioelectron.* **2002**, *17*, 1–12. [[CrossRef](#)]
 54. Gómez-Velasco, A.; León-Cortés, J.L.; Gordillo-Marroquín, C.; Sánchez-Pérez, H.J.; Alocilja, E.C.; Muñoz-Jiménez, S.G.; Enríquez-Ríos, N.; Bencomo-Alerm, A.; Jonapá-Gómez, L.; Gómez-Bustamante, A. Use of magnetic nanoparticles and a biosensor for the diagnosis and monitoring of emergent, re-emergent and neglected tropical infectious diseases. *Rev. Enf. Emerg.* **2019**, *18*, 23–31.
 55. Cios, K.J.; William Moore, G.; Moore, G.W. Unique features of medical data mining and knowledge discovery; Ethical; Security and legal aspects of medical data mining. *Artif. Intell. Med.* **2002**, *26*, 1–24. [[CrossRef](#)]
 56. Ortolani, C.; Ispano, M.; Pastorello, E.A.; Ansaloni, R.; Magri, G.C. Comparison of results of skin prick tests (with fresh foods and commercial food extracts) and RAST in 100 patients with oral allergy syndrome. *J. Allergy Clin. Immunol.* **1989**, *83*, 683–690. [[CrossRef](#)]
 57. Assis, T.S.M.; Azevedo-da-Silva, A.L.F.; Oliveira, D.; Cota, G.; Werneck, G.L.; Rabello, A. Budgetary impact of diagnostic tests for visceral leishmaniasis in Brazil. *Cad. Saúde Pública* **2017**, *33*, 1–8. [[CrossRef](#)]
 58. Faria, A.R.; de Andrade, H.M. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Major technological advances and few practical applications. *Rev. Pan-Amaz Saúde* **2012**, *3*, 47–57. [[CrossRef](#)]



APÊNDICE B - DADOS SUPLEMENTARES

As amostras de soro testadas (Figura 10), compreenderam pacientes isoladas para Leishmaniose aguda (1, 7-10), Leishmaniose Crônica (2-6), Chagas Digestiva (14), Chagas Cardíaca (15-17, 19), Chagas Indeterminada (11-13, 18, 20) e Negativos para Chagas e Leishmania (20-30). Além disso, foram testados Pools de pacientes das classificações acima, os pools foram obtidos após uma mistura dessas enfermidades. Pool Leishmaniose aguda (1'), Pool Leishmaniose Crônica (2'), Pool Chagas Digestiva (5'), Pool Chagas Cardíaca (4'), Pool Chagas Indeterminada (3'), Pool inicial Chagas (7'), Pool inicial de Leishmania (8'), Pool Negativos para Chagas e Leishmania (6') e Branco (B).



Figura 10: Placa de ELISA para realização de testes imunológicos

Os resultados para ELISA indireto indicam baixa especificidade (Tabela 5). Os testes ELISA indireto apresentaram baixa especificidade. Como esperado, a reação cruzada ocorreu, havendo discriminação somente nos soros positivos dos pacientes com Leishmaniose aguda, conforme apresentado na Figura 10 com pool dos soros

entre as doenças tipificadas e Tabela 5 demonstrativo da reação cruzadas entre as doenças.

Tabela 5: Representação dos valores obtidos por Índice ELISA (IE) das amostras (A:). Os valores acima de 1,4 são considerados positivos para o testes.

A: IE	A: IE	A: IE	A: IE	A: IE	A: IE	A: IE
1: 2,76	7: 4,63	13: 4,60	19: 5,33	25: 0,94	1': 4,68	7': 1,79
2: 1,16	8: 3,90	14: 2,58	20: 2,55	26: 0,85	2': 1,81	8': 1,59
3: 4,32	9: 5,27	15: 3,11	21: 0,95	27: 1,58	3': 3,59	
4: 2,39	10: 6,98	16: 1,94	22: 0,85	28: 0,70	4': 2,45	
5: 4,79	11: 2,91	17: 2,07	23: 0,85	29: 0,73	5': 1,36	
6: 3,01	12: 3,52	18: 4,55	24: 1,17	30: 1,11	6': 0,92	

Em virtude do baixo valor preditivo do teste ELISA, existe a possibilidade de resultados falsos. Por esta razão, o desenvolvimento de novas técnicas que identifiquem os anticorpos específicos e suas especificidades é necessária. Por isso, propusemos uma técnica mais seletiva e específica para a identificação das doenças e que evite as reações cruzadas.

APÊNDICE D - LISTA DE PARTICIPAÇÃO DE CO-AUTORES

Anielle Christine Almeida Silva. Professora Efetiva da Universidade Federal de Alagoas – UFAL. E-mail: acalmeida@fis.ufal.br

Carlo José Freire de Oliveira. Professor adjunto do Instituto de Ciências Biológicas e Naturais da Universidade Federal do Triângulo Mineiro – UFTM. E-mail: carlo@icbn.uftm.edu.br

Cristhianne Molinero Andrade Ratkevicius. Mestre em Ciências - Patologia Clínica. Doutoranda no Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde (UFTM). E-mail: cristhianne_m@hotmail.com

Dalmo Correia Filho. Professor Titular da Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM. E-mail: dalmo@mednet.com.br

Guilherme Felipe Simão. Mestrando no Program de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais (PPGCTM). E-mail: guilhermefelipesimao@gmail.com

Loren Queli Pereira. Mestre em Ciências - Patologia Clínica. Doutoranda no Programa de Pós Graduação em Medicina Tropical e Infectologia (UFTM). E-mail: lorenbiomedica@gmail.com

Marcos Vinícius da Silva. Professor Efetivo da Universidade Federal do Triângulo Mineiro – UFTM. E-mail: marcosuftm@gmail.com

Noelio Oliveira Dantas. Professor Associado IV da Universidade Federal de Alagoas – UFAL. E-mail: noelio@fis.ufal.br

Renata Pereira Alves Balvedi. Professora Adjunta do Magistério Superior na Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Campus Universitário Iturama (UFTM - ITU). E-mail: renata.balvedi@uftm.edu.br

Robson Tadeu Soares de Oliveira Júnior. Professor Associado II do Instituto de Ciência Biológicas e Naturais da Universidade Federal o Triângulo Mineiro – UFTM. E-mail: robson.junior@uftm.edu.br

Rodrigo Alejandro Abarza Muñoz. Professor Efetivo da Universidade Federal de Uberlândia – UFU. E-mail: munoz@ufu.br

Virmondes Rodrigues Júnior. Professor titular da Universidade Federal do Triângulo Mineiro – UFTM. E-mail: vrodrigues@mednet.com

Yanne Oliveira Barbosa. Mestranda no Programa de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas (UFTM). E-mail: yanne.way@hotmail.com

ANEXO A – RESULTADOS COMPLEMENTARES

A limpeza do eletrodo pós-eletr deposição é uma etapa crucial na formação de monocamadas (Figura 11), pois as impurezas podem dificultar a adsorção das moléculas ou causar defeitos diminuindo a reprodutibilidade e estabilidade da monocamada formada (Santos, 2016).

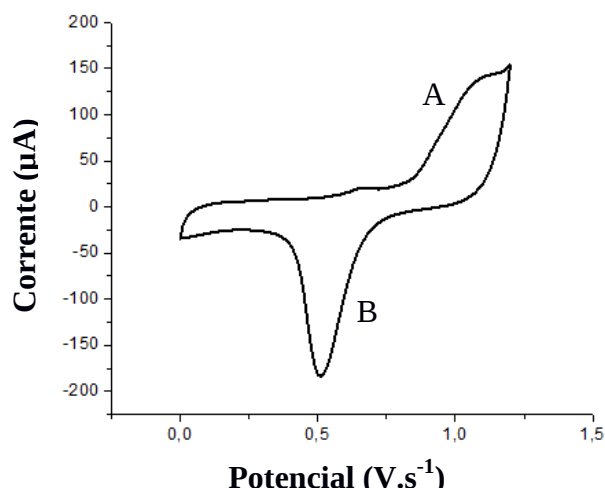


Figura 11: Representação limpeza eletroquímica. Limpeza eletroquímica da superfície do eletrodo de grafite eletrodepositado com ouro.

Para limpeza eletroquímica e posterior depósito do ouro, os eletrodos de grafite foram submetidos a um tratamento com VC de 30 ciclos em solução de H_2SO_4 1mol L^{-1} , na faixa de potencial entre -0,3 e +1,2 V a 100 mV s^{-1} . A eletr deposição de Au foi feita por VC, 15 ciclos, na faixa de potencial entre -0,3 e +1,0 V a 100 mV s^{-1} .

O voltamograma (Figura 8) indica processos anódicos provenientes da formação de hidróxido de ouro (A) e óxido de ouro (B), e um pico catódico, referente à redução dos compostos formados na varredura anódica (Santos, 2016). Assim, evidenciamos a efetiva deposição da camada de ouro sobre a superfície do eletrodo de grafite.

Ao compararmos, a olho nu, os eletrodos de grafite eletrodepositado (A) com ouro aos eletrodos de grafite virgem (B), são notáveis a mudança de coloração do eletrodo após a modificação (Figura 12). Essa alteração visível da coloração nos permite uma suposição, anterior a realização de testes eletroquímicos, da deposição eficiente das partículas de ouro.



Figura 12: Comparação entre os eletrodos: eletrodepositado com ouro (A) e grafite virgem (B).

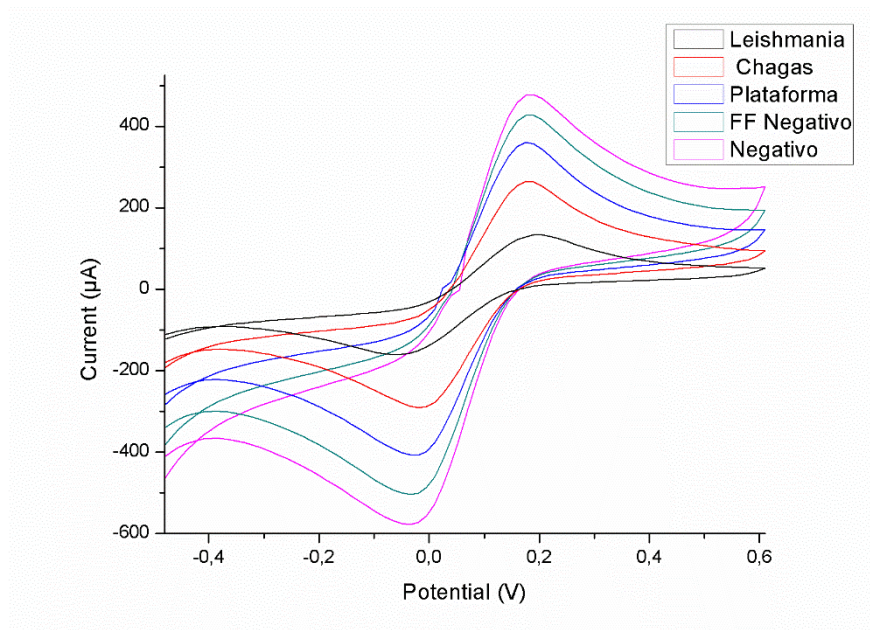


Figura 13: Voltamogramas cíclicos em diferentes plataformas, comparativo com negativo. Sendo Eletrodo de grafite com ouro eletrodepositado: Imunossensor. Diferentes pools para doenças. Leishmaniose; Chagas; Ag+BSA1% (plataforma); FF para realização de teste negativo; Teste negativo. Neste resultado fica evidente a confirmação do resultado negativo.

ANEXO B – NORMAS DA REVISTA CIENTÍFICA

Normas da revista Biosensor

<https://www.mdpi.com/journal/biosensors/instructions>