



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

LUANA BARBOSA SEVERINO

**DESENVOLVIMENTO DE UM IMUNOSENSOR ELETROQUÍMICO PIONEIRO  
PARA DETECÇÃO PRECISA DA LEISHMANIOSE VISCERAL HUMANA COM  
ANTÍGENO RECOMBINANTE PURIFICADO DE LEISHMANIA**

UBERABA

2024

LUANA BARBOSA SEVERINO

**DESENVOLVIMENTO DE UM IMUNOSENSOR ELETROQUÍMICO PIONEIRO  
PARA DETECÇÃO PRECISA DA LEISHMANIOSE VISCERAL HUMANA COM  
ANTÍGENO RECOMBINANTE PURIFICADO DE LEISHMANIA**

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 mestra em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Renata Pereira Alves

UBERABA

2024

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

S525d Severino, Luana Barbosa  
Desenvolvimento de um imunossensor eletroquímico pioneiro para  
detecção precisa da leishmaniose visceral humana com antígeno recombi-  
nante purificado de leishmania / Luana Barbosa Severino. -- 2024.  
46 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) -- Universidade  
Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2024  
Orientadora: Profa. Dra. Renata Pereira Alves

1. Leishmaniose visceral. 2. Eletroquímica. 3. Vacinas sintéticas.  
4. Soro. I. Alves, Renata Pereira. II. Universidade Federal do Triângulo  
Mineiro. III. Título.

CDU 616.993.161

**LUANA BARBOSA SEVERINO****DESENVOLVIMENTO DE UM IMUNOSSENSOR ELETROQUÍMICO PIONEIRO PARA DETECÇÃO PRECISA DA LEISHMANIOSE VISCERAL HUMANA COM ANTÍGENO RECOMBINANTE PURIFICADO DE LEISHMANIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em **CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**, área de concentração **“I - BIOQUÍMICA, FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA”** (Linha de Pesquisa: **BIOSENSORES**) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro como requisito parcial para obtenção do título de mestre.

Uberaba, 29 de outubro de 2024.

**Banca Examinadora:**

Dra. Renata Pereira Alves – Orientadora  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Dr. Thiago dos Santos Almeida  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Dr. Marcelo Rodrigues Pinto  
Universidade de Uberaba - UNIUBE



Documento assinado eletronicamente por **RENATA PEREIRA ALVES, Professor do Magistério Superior**, em 01/11/2024, às 09:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#) e no art. 34 da [Portaria Reitoria/UFTM nº 215, de 16 de julho de 2024](#).



Documento assinado eletronicamente por **THIAGO DOS SANTOS ALMEIDA**, Professor do Magistério Superior, em 01/11/2024, às 09:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#) e no art. 34 da [Portaria Reitoria/UFTM nº 215, de 16 de julho de 2024](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Marcelo Rodrigues Pinto**, Usuário Externo, em 01/11/2024, às 20:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#) e no art. 34 da [Portaria Reitoria/UFTM nº 215, de 16 de julho de 2024](#).

---



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [http://sei.uftm.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](http://sei.uftm.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1355759** e o código CRC **DDF2B36A**.

---

Dedico à minha mãe por ser minha fonte de motivação nessa jornada, por me acalmar nos momentos de angústia. À minha irmã por todo apoio e paciência que foram cruciais durante o processo. Ao meu pai que lá de cima há de estar orgulhoso. Ao universo por ter me apresentado minha paz em forma de pessoa, minha namorada, a quem também dedico este trabalho.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à minha família e amigos que me acompanharam durante esse processo e que me deram forças pra continuar.

À professora Renata Pereira Alves pela oportunidade e orientação.

Às colegas de laboratório Beatriz Rodrigues Martins e Cristhianne Molinero Andrade Ratkevicius pelo auxílio na realização deste trabalho.

“A educação é um processo social, é desenvolvimento. Não é a preparação para a vida, é a própria vida”.

John Dewey

## RESUMO

A leishmaniose é uma doença que afeta grande parte da população da América Latina, especialmente no Brasil. Tem uma alta taxa de mortalidade se não for tratada. Os principais métodos diagnósticos atualmente utilizados baseiam-se em sinais e sintomas sugestivos associados a testes parasitológicos e/ou imunológicos, no entanto, tais testes apresentam desvantagens como baixa sensibilidade e especificidade, alto custo, necessidade de laboratórios equipados e profissionais qualificados. Assim, é necessário ter um diagnóstico rápido, preciso, de baixo custo, portátil e com boa sensibilidade e especificidade. Neste estudo, foi utilizado um antígeno recombinante denominado DTL-4 devido ao seu potencial para melhorar a sensibilidade e especificidade dos testes, pois permite apenas a ligação específica com o anticorpo no soro de pacientes com a doença. Os resultados do imunossensor proposto mostraram um limite de detecção estimado de  $0,0442 \text{ ng mL}^{-1}$ . A ausência de modificações com nanopartículas de ouro é outro ponto interessante quando comparamos o custo relacionado ao biossensor em questão com outros métodos diagnósticos. Assim, o imunossensor proposto tem baixo custo, alta especificidade e sensibilidade. Dessa forma, o biossensor em questão se mostra promissor para validar a plataforma de diagnóstico e seu futuro uso portátil em saúde pública.

Palavras-chave: Imunossensor, Leishmaniose Visceral Humana, Antígeno Recombinante, Soro, Eletroquímico.

## ABSTRACT

Leishmaniasis is a disease that affects a large part of the population of Latin America, especially in Brazil. It has a high mortality rate if left untreated. The main diagnostic methods currently used are based on signs and symptoms suggestive associated with parasitological and/or immunological tests, however, such tests have disadvantages such as low sensitivity and specificity, high cost, need for equipped laboratories and qualified professionals. Thus, it is necessary to have a fast, accurate, low-cost, portable diagnosis that has good sensitivity and specificity. In this study, a recombinant antigen called DTL-4 was used because of its potential to improve the sensitivity and specificity of the tests because it only allows specific binding with the antibody in the serum of patients with the disease. The results of the proposed immunosensor showed an estimated detection limit of  $0.0442 \text{ ng mL}^{-1}$ . The absence of modifications with gold nanoparticles is another interesting point when we compare the cost related to the biosensor in question with other diagnostic methods. Thus, the proposed immunosensor has low cost, high specificity and sensitivity. In this way, the biosensor in question shows promise for validating the diagnostic platform and its future portable use in public health.

**Keywords:** Immunosensor, Human Visceral Leishmaniasis, Recombinant Antigen, Serum, Electrochemical.

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                |        |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| <b>Figura 1:</b> Casos de leishmaniose visceral por unidades federativas de infecção .....     | (p.15) |
| <b>Figura 2:</b> Percentual de letalidade por leishmaniose visceral. Brasil, 2013 a 2022 ..... | (p.15) |
| <b>Figura 3:</b> Ciclo de vida da leishmania, 2017 .....                                       | (p.17) |
| <b>Figura 4 -</b> Elementos de um biossensor .....                                             | (p.24) |
| <b>Figura 5:</b> Representação da estrutura de um anticorpo.....                               | (p.26) |
| <b>Figura 6:</b> Representação esquemática da técnica de voltametria cíclica .....             | (p.31) |

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** - Casos confirmados de leishmaniose visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 2018 a 2022..... (p. 14).

**Tabela 2** – Relação dos principais métodos utilizados para o diagnóstico de leishmaniose visceral..... (p. 22).

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

Ag – Antígeno

Au - ouro

AuNP's – Nanopartículas de ouro

CDC – Centers for Disease Control and Prevention

DAT - Direct Agglutination Test

DNA - Deoxyribonucleic acid

ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Fab – Fragment antigen-binding

FAST – Fast Agglutination Screening Test

Fc – Fragmento cristalizável

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

IC – Imunocromatografia

Ig - Imunoglobulinas

LV – Leishmaniose Visceral

LT – Leishmaniose Tegumentar

OPAS – Organização Pan Americana da Saúde

pH – Potencial Hidrogeniônico

PCR – Polymerase Chain Reaction

RIFI - Reação de imunofluorescência indireta

SINAN – Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SUS – Sistema Único de Saúde

SVSA - Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente

VC – Voltametria Cíclica

WHO – World Health Organization

## SUMÁRIO

|                                                                   |    |
|-------------------------------------------------------------------|----|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....                                        | 14 |
| 1.1 LEISHMANIOSES .....                                           | 15 |
| 1.2 CICLO DE VIDA DA LEISHMANIA .....                             | 18 |
| 1.3 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS PARA LEISHMANIOSES .....                 | 19 |
| <b>1.3.1 Métodos imunológicos</b> .....                           | 19 |
| 1.3.1.1 <i>Teste rápido imunocromatográfico</i> .....             | 19 |
| 1.3.1.2 <i>Reação de imunofluorescência indireta (RIFI)</i> ..... | 20 |
| 1.3.1.3 <i>Ensaio imunoenzimático (ELISA)</i> .....               | 20 |
| 1.3.1.4 <i>Western blot</i> .....                                 | 20 |
| 1.3.1.5 <i>Teste de aglutinação direta (DAT)</i> .....            | 21 |
| <b>1.3.2 Métodos parasitológicos</b> .....                        | 21 |
| <b>1.3.3 Método molecular</b> .....                               | 21 |
| 1.4 REAÇÃO CRUZADA .....                                          | 23 |
| 1.5 BIOSSENSORES .....                                            | 23 |
| <b>1.5.1 Biossensor eletroquímico</b> .....                       | 24 |
| <b>1.5.2 Imunossensores</b> .....                                 | 24 |
| <b>1.5.4 Imobilização de moléculas</b> .....                      | 25 |
| 1.5.5 Eletrodos modificados .....                                 | 25 |
| 1.5.5.1 <i>Eletrodos de grafeno</i> .....                         | 26 |
| 1.5.5.2 <i>Eletrodeposição de ouro</i> .....                      | 26 |
| <b>1.5.6 Antígeno purificado</b> .....                            | 26 |
| <b>1.5.7 Técnicas eletroquímicas</b> .....                        | 27 |
| 1.5.7.1 <i>Voltametria cíclica</i> .....                          | 27 |
| REFERÊNCIAS .....                                                 | 28 |
| APÊNDICE A - ARTIGO .....                                         | 32 |
| APÊNDICE B - COMPROVANTE DE SUBMISSÃO .....                       | 45 |

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 LEISHMANIOSES

A leishmaniose é uma doença infecciosa não contagiosa causada por protozoários flagelados do gênero *Leishmania*. Possui como vetor o flebótomo fêmea conhecido popularmente como mosquito palha ou calazar que, quando infectada, transmite a doença ao hospedeiro através do repasto sanguíneo (Steverding D 2017).

O parasita existe em duas formas. A forma de promastigota (indica presença de flagelo) é encontrada no sistema gastrointestinal e bucal do mosquito, já a forma de amastigota (indica ausência de flagelo) é encontrada no hospedeiro, que são os mamíferos como cães, ratos e o ser humano. De acordo com o agente etiológico, o protozoário tem tropismo pelo sistema tegumentar ou visceral do hospedeiro. Em raras situações, espécies dermatotrópicas podem eviscerar, como é o caso de pacientes imunossuprimidos (Van Griensven J e Diro E, 2019).

Existem duas principais formas de manifestação da doença. A leishmaniose tegumentar (LT) ou cutânea é causada principalmente pela espécie *Leishmania brasiliensis* que são encontradas em todo Brasil, causam lesões tanto em mucosas como na pele, podendo ocorrer de forma localizada, difusa ou mucocutânea (Steverding D 2017). Outra forma de manifestação da doença é a leishmaniose visceral (LV), que será o ponto alvo deste estudo. É causada principalmente pelas espécies *Leishmania chagasi* e *Leishmania infantum*. Os principais órgãos acometidos por ela são: fígado, baço e medula óssea, sendo a última, resultante da forma mais grave da doença. Os principais sintomas da leishmaniose visceral incluem crises irregulares de febre, perda substancial de peso, hepatomegalia (aumento do fígado), esplenomegalia (aumento do baço) e anemia grave (WHO, 2024).

Segundo dados do Ministério da Saúde (2022), a leishmaniose visceral causa endemias em 76 países do mundo. Só na América Latina, mais de 90% dos casos ocorrem no Brasil. Anualmente no país, os números podem chegar a 3.500 novos casos anuais. Mundialmente, a doença pode acometer de 200 a 400 mil indivíduos por ano. E sem tratamento, em média 95% vão a óbito (WHO, 2024). A doença ainda é amplamente negligenciada no Brasil, principalmente em populações de vulnerabilidade social como baixa renda, condições desfavoráveis de moradia, segurança e situação laboral (Okwor I e Uzonna JE, 2016).

Segundo dados obtidos do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN, 2024), em 2022 o Brasil registrou 1.684 casos de leishmaniose visceral, sendo Minas Gerais o

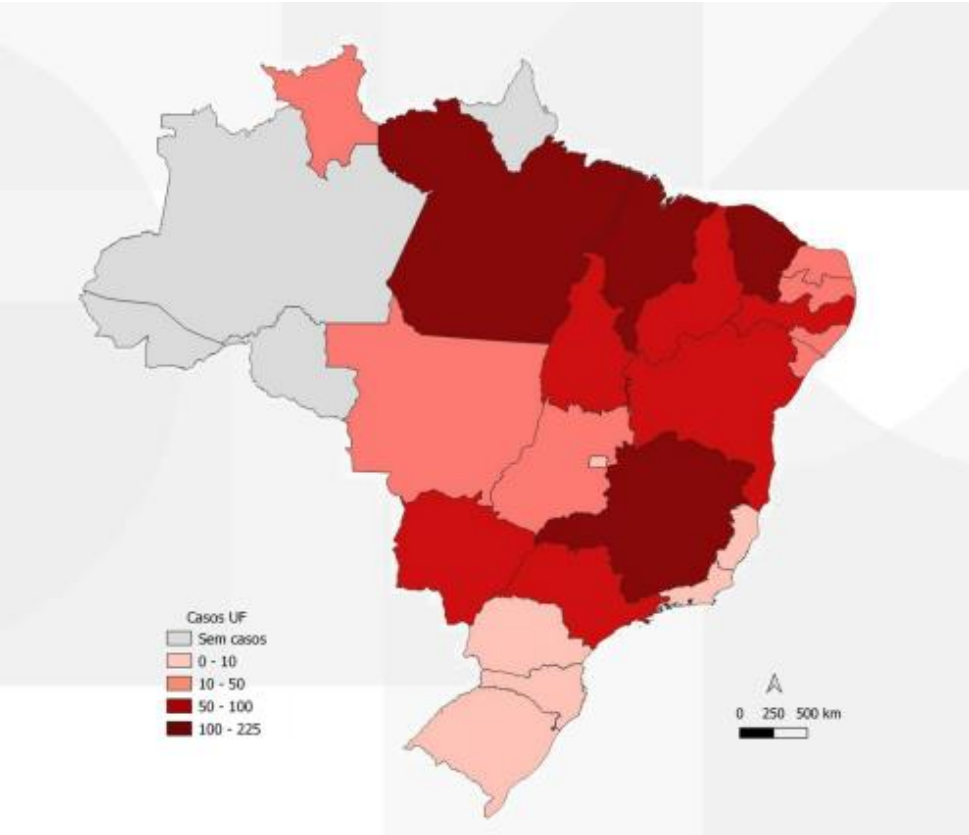
segundo estado com maior número de casos (tabela 1 e figura 1). No mesmo ano, o percentual de mortalidade por leishmaniose visceral humana foi de 10,7%, sendo o maior dos últimos 10 anos (figura 2). O que diz muito a respeito das políticas de prevenção e combate aos vetores.

**Tabela 1** - Casos confirmados de leishmaniose visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 2018 a 2022 - adaptada.

| Região e UF                | 2018         | 2019         | 2020         | 2021         | 2022         |
|----------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| <b>Brasil</b>              | <b>3.466</b> | <b>2.529</b> | <b>1.933</b> | <b>1.683</b> | <b>1.684</b> |
| <b>Região Norte</b>        | <b>737</b>   | <b>480</b>   | <b>308</b>   | <b>265</b>   | <b>237</b>   |
| Rondônia <sup>1</sup>      | 0            | 0            | 0            | 0            | 0            |
| Acre <sup>1</sup>          | 0            | 0            | 0            | 0            | 0            |
| Amazonas <sup>1</sup>      | 0            | 0            | 0            | 0            | 0            |
| Roraima                    | 13           | 11           | 16           | 17           | 14           |
| Pará                       | 503          | 306          | 187          | 151          | 136          |
| Amapá                      | 1            | 0            | 2            | 0            | 0            |
| Tocantins                  | 220          | 163          | 103          | 97           | 87           |
| <b>Região Nordeste</b>     | <b>1.735</b> | <b>1.241</b> | <b>959</b>   | <b>775</b>   | <b>731</b>   |
| Maranhão                   | 653          | 390          | 329          | 249          | 225          |
| Piauí                      | 179          | 140          | 103          | 60           | 71           |
| Ceará                      | 308          | 258          | 177          | 168          | 189          |
| Rio Grande do Norte        | 51           | 42           | 27           | 21           | 30           |
| Paraíba                    | 38           | 32           | 15           | 21           | 22           |
| Pernambuco                 | 112          | 105          | 71           | 67           | 55           |
| Alagoas                    | 95           | 66           | 58           | 54           | 29           |
| Sergipe                    | 61           | 56           | 37           | 20           | 40           |
| Bahia                      | 238          | 152          | 142          | 115          | 70           |
| <b>Região Sudeste</b>      | <b>428</b>   | <b>323</b>   | <b>256</b>   | <b>233</b>   | <b>245</b>   |
| Minas Gerais               | 324          | 231          | 181          | 167          | 151          |
| Espírito Santo             | 6            | 5            | 0            | 1            | 2            |
| Rio de Janeiro             | 4            | 7            | 3            | 4            | 9            |
| São Paulo                  | 94           | 80           | 72           | 61           | 83           |
| <b>Região Sul</b>          | <b>11</b>    | <b>13</b>    | <b>7</b>     | <b>6</b>     | <b>6</b>     |
| Paraná                     | 7            | 7            | 1            | 1            | 1            |
| Santa Catarina             | 0            | 0            | 1            | 0            | 1            |
| Rio Grande do Sul          | 4            | 6            | 5            | 5            | 4            |
| <b>Região Centro-Oeste</b> | <b>122</b>   | <b>129</b>   | <b>90</b>    | <b>83</b>    | <b>105</b>   |
| Mato Grosso do Sul         | 78           | 97           | 48           | 47           | 75           |
| Mato Grosso                | 14           | 6            | 12           | 10           | 18           |
| Goiás                      | 28           | 25           | 27           | 23           | 11           |
| Distrito Federal           | 2            | 1            | 3            | 3            | 1            |
| <b>UF ignorada</b>         | <b>433</b>   | <b>343</b>   | <b>313</b>   | <b>321</b>   | <b>360</b>   |

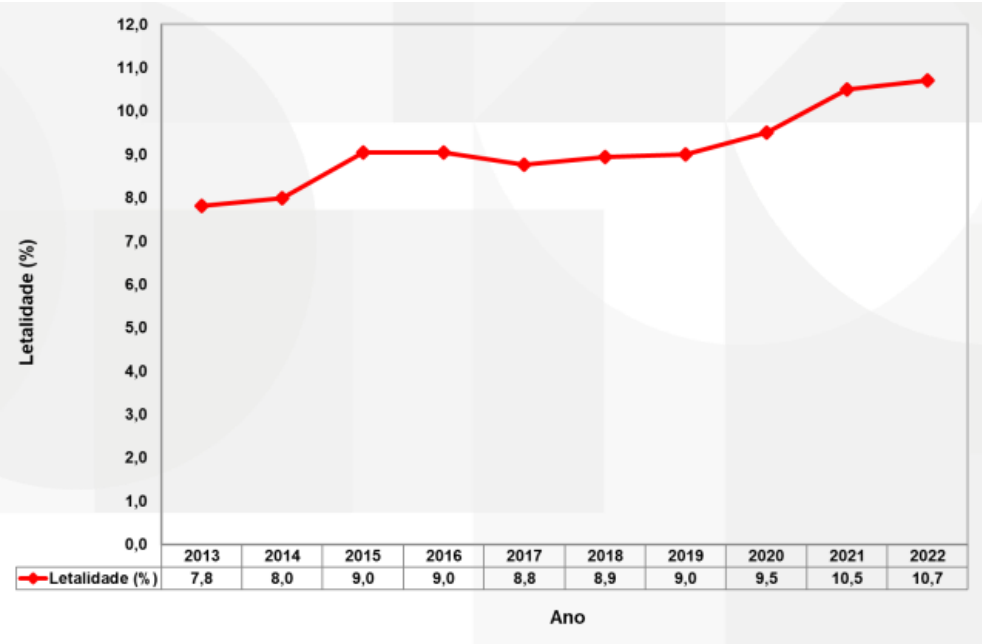
**Fonte:** SINAN, 2024 (Adaptada).

**Figura 1:** Casos de leishmaniose visceral por unidades federativas de infecção



Fonte: SVSA, 2022.

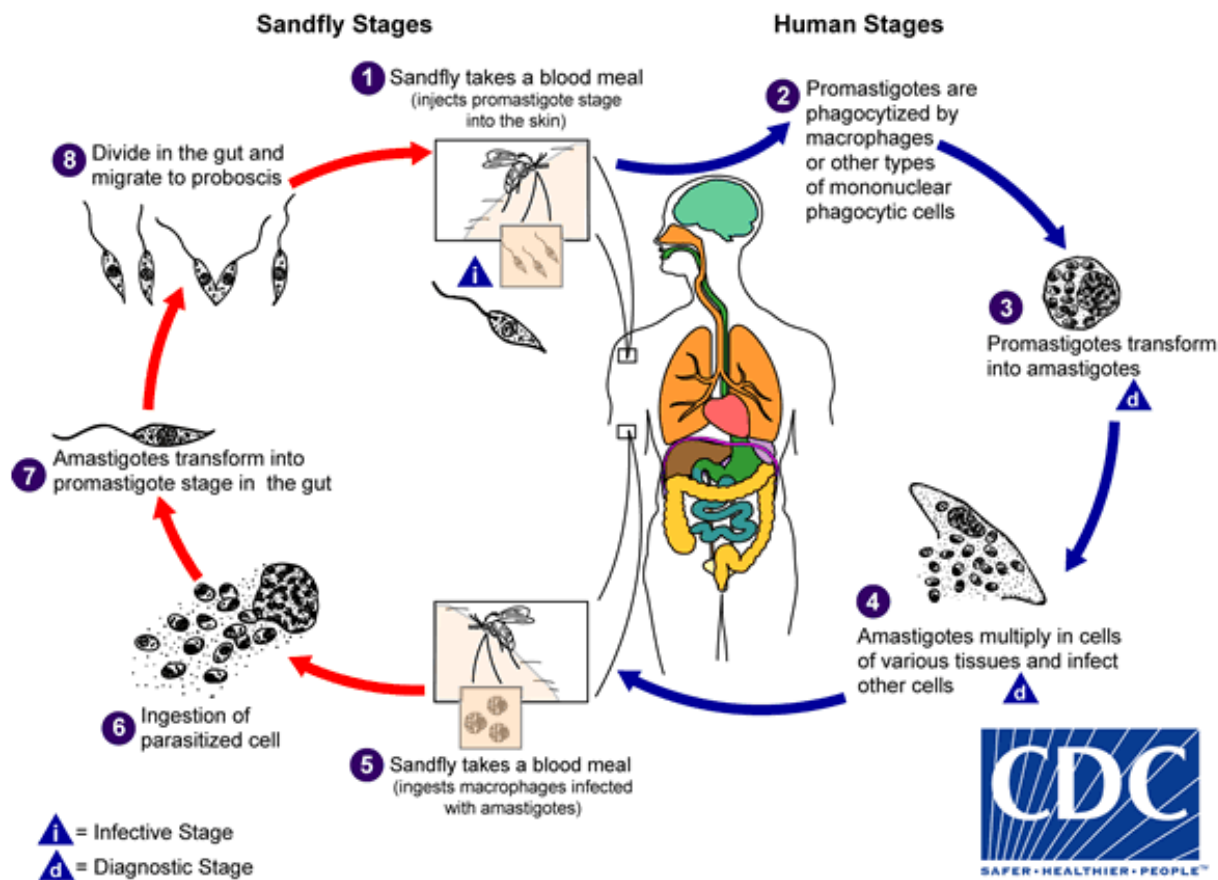
**Figura 2 -** Percentual de letalidade por leishmaniose visceral. Brasil, 2013 a 2022.



Fonte: SVSA, 2022

Sabe-se que a vacinação é o meio mais econômico e eficaz na prevenção de doenças infecciosas, porém, para a leishmaniose humana a vacinação ainda não é uma realidade devido à dificuldade de produção e padronização. O tratamento da doença fica a cargo de medicações leishmanicidas, porém, os efeitos colaterais (arritmias, hepatites e disfunções renais) são fatores complicadores e que estão associados ao abandono do tratamento e consequentemente resistência aos medicamentos em países subdesenvolvidos (Ghorbani M e Farhoudi R, 2017).

## 1.2 CICLO DE VIDA DA LEISHMANIA



Fonte: CDC, 2024.

**Figura 3:** Ciclo de vida da leishmania, 2024.

Quando um mosquito infectado realiza o repasto sanguíneo ele transmite a doença injetando promastigotas no hospedeiro. Na leishmaniose tegumentar, os parasitas são fagocitados por macrófagos residentes na pele e se transformam de promastigotas em amastigotas. Quando a célula hospedeira não comporta mais o grande número dos parasitas, ela se rompe e os amastigotas liberados infectarão outros macrófagos (figura 3). A combinação do processo inflamatório causado pela sinalização ao sistema imune na presença dos parasitas em conjunto com a disseminação dos mesmos é responsável pelas lesões características da doença

em sua forma cutânea. Já na leishmaniose visceral, no entanto, as amastigotas liberadas são espalhadas pela circulação sanguínea e infectam células do sistema de fagócitos mononucleares do fígado, baço, medula óssea, linfonodos e intestino. O ciclo continua quando um mosquito não infectado realiza a alimentação sanguínea em um hospedeiro infectado ingerindo o parasita na forma de amastigotas (figura 3). (Van Griensven J, Diro E, 2019). Nos flebotomíneos infectados, os amastigotas ingeridos são transformados no intestino do inseto em promastigotas, se desenvolvem e migram para a tromba e serão transferidos ao hospedeiro novamente através do repasto sanguíneo reiniciando o ciclo de infecção (figura 3) (CDC, 2024).

### 1.3 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS PARA LEISHMANIOSES

O diagnóstico das leishmanioses é realizado através de dois grandes pilares: sinais e sintomas sugestivos da doença presentes no indivíduo e exames complementares laboratoriais, sendo esses exames imunológicos e/ou parasitológicos. Os exames imunológicos atualmente disponibilizados no Brasil pelo Sistema Único de Saúde (SUS) consistem no teste de reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e no teste rápido imunocromatográfico. O ensaio imunoenzimático (ELISA) também pode ser utilizado para diagnóstico da doença. Os testes parasitológicos consistem na busca pelo parasita por exame direto ou isolamento em cultura, preferencialmente por aspirado de medula óssea. Testes moleculares também podem ser utilizados, pois detectam o DNA do parasita através do teste de PCR (do inglês polymerase chain reaction) (OPAS, 2022).

#### 1.3.1 Métodos imunológicos

Baseado na reação específica que ocorre através da resposta humoral do indivíduo ao entrar em contato com o parasito. Desse modo, possuem a mesma desvantagem quando se observou que os anticorpos permanecem circulantes por muito tempo após a cura do paciente, o que tornam esses testes positivos, mesmo que o indivíduo não apresente mais a doença (Elmahallawy EK *et al.*, 2014).

##### 1.3.1.1 Teste rápido imunocromatográfico

O teste imunocromatográfico (IC) utiliza o antígeno recombinante rK39. Em testes realizados no Brasil, observou-se variações de sensibilidade e especificidade entre as regiões estudadas. O IC rk39, apresentou em amostras da cidade de Natal, Rio Grande do Norte, sensibilidade de 80% utilizando sangue total e soro, e sensibilidade de 43,3% utilizando saliva. Quanto à especificidade, apresentou 100% no sangue total 96,3% no soro e 95,3% na saliva

(Sanchez MCA *et al.*, 2020). O IC rk39 possui como vantagens ser versátil, fácil de usar em campo, barato e reproduzir resultados de forma rápida (15 a 20 minutos).

#### *1.3.1.2 Reação de imunofluorescência indireta (RIFI)*

Consiste na reação de anticorpos presentes na amostra com os antígenos do parasita fixados em lâminas de microscopia utilizando um conjugado fluorescente. (FIOCRUZ, 2022). Apresentou variância de sensibilidade de 78,8% e especificidade de 96,2% em um estudo realizado para verificar o desempenho de testes utilizados na detecção de leishmaniose visceral no Brasil (Freire ML 2019). Sua principal desvantagem consiste na necessidade de um laboratório equipado com microscópio de fluorescência, restringindo o uso do teste de RIFI aos laboratórios de referência (Elmahallawy EK *et al.*, 2014).

#### *1.3.1.3 Ensaio imunoenzimático (ELISA)*

O ELISA é comumente o teste mais realizado para o sorodiagnóstico da LV por poder ser facilmente realizado e ser adaptável para uso em diversas moléculas antigênicas. (Piyasiri SB *et al.*, 2022). A técnica é altamente sensível, mas a especificidade depende do antígeno utilizado. Desvantagens relacionadas à reatividade cruzada com soros de pacientes com tuberculose, tripanossomíase, toxoplasmose e principalmente doença de chagas tem sido relatada nos ensaios imunoenzimáticos realizados (Matos HJ *et al.*, 2015). Com intuito de melhorar a acurácia dos resultados do teste ELISA, um estudo realizou testes utilizando a proteína quimérica DTL-4, onde obteve-se sensibilidade e especificidade de 94,61% e 99,41% respectivamente (Figueiredo MM *et al.*, 2021). Devido a necessidade de profissionais especializados, equipamentos e exigência de eletricidade a realização desse teste é restrito ao âmbito laboratorial (Elmahallawy EK *et al.*, 2014).

#### *1.3.1.4 Western blot*

Western blot consiste em um teste onde as promastigotas são cultivadas e lisadas. As proteínas que foram separadas são eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose que reagem posteriormente com o soro do indivíduo (Ravindran R *et al.*, 2004). A sensibilidade dos testes alcança 91% e especificidade pode chegar a 100%. No entanto, possui custo e tempo elevados para sua realização bem como necessidade de equipamentos complexos e profissionais qualificados limitando seu uso a laboratórios de pesquisa (Elmahallawy EK *et al.*, 2014).

#### 1.3.1.5 Teste de aglutinação direta (DAT)

É um teste baseado na aglutinação direta de leishmania na forma de promastigotas que reagem com anticorpos anti-leishmania no soro. Porém, não difere uma infecção atual de uma infecção passada, podendo apresentar-se positivo mesmo após anos da cura (Takur S, Joshi J e Kaur S, 2020).

A sensibilidade do teste de aglutinação direta pode variar de 70,5% a 100% e a especificidade de 53% a 100% (Mondal S, Bhattacharya P e Ali N, 2010). Possui como limitação o tempo de incubação que podem variar de 12 a 18 horas e as diluições seriadas das amostras que são necessárias para a realização do teste (Akhoundi B *et al.*, 2010). Para resolver esse problema, foi desenvolvido por Schoone e colaboradores (em 2001) um teste de triagem de aglutinação rápida denominado FAST (do inglês Fast Agglutination Screening Test). O teste requer 2 horas de incubação e apenas uma diluição do soro. Mostrou em um estudo realizado por Hailu e colaboradores (2006) a sensibilidade e especificidade de 91,1% e 70,5% respectivamente.

#### 1.3.2 Métodos parasitológicos

O diagnóstico através dos métodos parasitológicos consiste na visualização através microscópica de amastigotas presentes em esfregaços realizados por raspados de lesões ou aspirado do baço ou medula óssea (Elmahallawy EK *et al.*, 2014). A sensibilidade depende do local em que a amostra é coletada. Na medula óssea pode apresentar até 85%. As que apresentam maior sensibilidade (93%) observada são os aspirados esplênicos (baço). Porém, uma desvantagem desse método é o risco de hemorragia mesmo quando realizado por profissional altamente qualificado (Srivastava P *et al.*, 2011; Barrett MP e Croft SL, 2012). A sensibilidade observada nos esfregaços de sangue periférico é baixa, principalmente em indivíduos com baixa parasitemia (Elmahallawy EK *et al.*, 2014).

#### 1.3.3 Método molecular

Testes da reação em cadeia da polimerase (PCR) realizados com amostras do baço apresentaram sensibilidade de 98,8% e especificidade de 100%, porém a coleta é realizada por um procedimento altamente invasivo (Shahbazi F *et al.* 2008). A amostra ideal é o sangue periférico, porém as sensibilidades variam de 70% a 100% (Lachaud L *et al.*, 2000). As técnicas de PCR são complexas e dispendiosas, em países endêmicos para leishmaniose visceral, os testes são restritos a poucos hospitais de ensino e centros de pesquisa (Elmahallawy EK *et al.*, 2014).

Tabela 2: Relação dos principais métodos utilizados para o diagnóstico de leishmaniose visceral

| MÉTODO                                    | SENSIBILIDADE                                | ESPECIFICIDADE                                  | VANTAGENS                                                                                                                         | DESVANTAGENS                                                                                                                     | REFERÊNCIAS                                                                                                     |
|-------------------------------------------|----------------------------------------------|-------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>IMUNOLÓGICO</b><br>Imunocromatográfico | 80% (sangue total e soro)<br>43,3% (saliva). | 100% (sangue)<br>96,3% (soro)<br>95,3% (saliva) | Versátil para uso em campo, barato e reproduz resultados rápidos.                                                                 | Não difere infecção atual de passada.                                                                                            | Sanchez MCA <i>et al.</i> , 2020.<br>Elmahallawy EK <i>et al.</i> , 2014.                                       |
| RIFI                                      | 78,8% (soro)                                 | 96,2% (soro)                                    | Alta especificidade.                                                                                                              | Necessidade de um laboratório equipado com microscópio de fluorescência.                                                         | Freire ML 2019.<br>Elmahallawy EK <i>et al.</i> , 2014.                                                         |
| ELISA                                     | 94,61 (soro)                                 | 99,41 (soro)                                    | Altamente sensível, facilmente realizado e adaptável para uso em diversas moléculas antigênicas                                   | Especificidade depende do antígeno utilizado. Relatos de reatividade cruzada. Restrito a laboratórios.                           | Figueiredo MM <i>et al.</i> , 2021.<br>Elmahallawy EK <i>et al.</i> , 2014.                                     |
| Western blot                              | 91% (soro)                                   | 100% (soro)                                     | Alta sensibilidade e especificidade, especialmente nos casos de leishmaniose cutânea                                              | Custo e tempo elevados. Necessidade de equipamentos complexos e profissionais qualificados.                                      | Ravindran R <i>et al.</i> , 2004.<br>Elmahallawy EK <i>et al.</i> , 2014.                                       |
| DAT                                       | 70,5% - 100% (soro)                          | 53% a 100% (soro)                               | Barato, de fácil execução, utilizado com soro, plasma ou o sangue total.                                                          | Não difere infecção atual de passada. Tempo de incubação prolongado e diluição seriada das amostras.                             | Takur S, Joshi J e Kaur S, 2020.<br>Mondal S, Bhattacharya P e Ali N, 2010.<br>Akhoundi B <i>et al.</i> , 2010. |
| FAST                                      | 91,1% (soro)                                 | 70,5% (soro)                                    | Fácil execução, tempo de incubação reduzido, diluição única da amostra.                                                           | Teste rápido de triagem, não difere infecção atual de passada.                                                                   | Schoone GJ <i>et al.</i> , 2001.<br>Hailu A <i>et al.</i> , 2006.                                               |
| <b>PARASITOLÓGICO</b>                     | 85% (medula óssea)<br>95% (baço)             | -                                               | Permite visualização direta das amastigotas em diversas amostras. Pode ser potencializado se realizado concomitante com culturas. | Risco de hemorragia (punção do baço). Necessário habilidades e conhecimentos técnicos. Sensibilidade baixa de sangue periférico. | Srivastava P <i>et al.</i> , 2011.<br>Barrett MP e Croft SL, 2012.<br>Elmahallawy EK <i>et al.</i> , 2014.      |
| <b>MOLECULAR</b>                          | 98,8% (baço)<br>70% (sg periférico)          | 100% (baço)<br>100% (sg periférico)             | A depender do local de coleta, os testes são altamente sensíveis e específicos.                                                   | Invasivo (coleta do baço). Necessário profissional capacitado, técnicas complexas e caras.                                       | Shahbazi F <i>et al.</i> 2008.<br>Lachaud L <i>et al.</i> , 2000.                                               |

Fonte: própria da autora

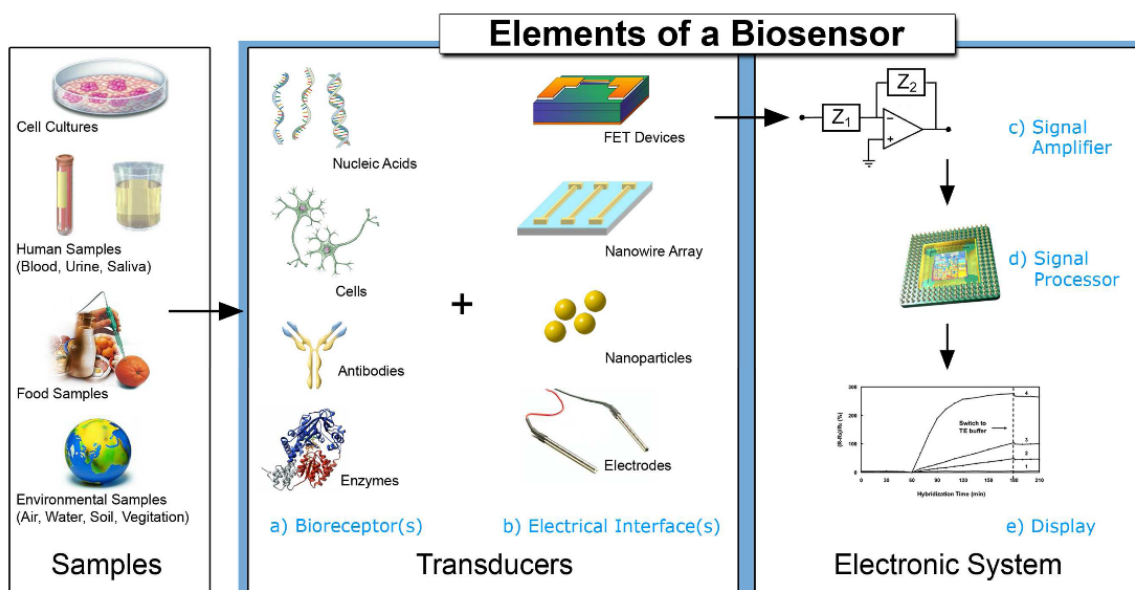
## 1.4 REAÇÃO CRUZADA

Devido à grande complexidade de proteínas presentes nos antígenos e também da heterogeneidade das amostras, reações cruzadas podem acontecer no diagnóstico da leishmaniose, levando a falsos positivos ou falsos negativos (Matos HJ *et al*, 2015). A doença de chagas compõe uma das principais doenças em que essa reação cruzada pode acontecer devido à semelhança de glicoproteínas presentes na superfície dos parasitas *Tripanossoma cruzi* (protozoário causador da doença de chagas) e a *Leishmania spp.* (protozoários causadores da leishmaniose) (Cervantes-Landín AY *et al.*, 2014)

## 1.5 BIOSSENSORES

Os biossensores destacam-se por sua importância analítica em diagnósticos clínicos, monitoramento de doenças através de marcadores encontrados em diversos analitos, detecção de fármacos, poluentes e organismos causadores de doenças. O biossensor é composto por elementos fundamentais que possibilitam a ocorrência desde a interação das moléculas até a leitura dos sinais através de gráficos, tabelas, entre outros. O analito é a substância de interesse a ser detectada através de diversas amostras (sangue, saliva, suor e urina). O bioreceptor consiste na molécula que reage especificamente com o analito de interesse. O princípio do biossensor é que este esteja conectado a um transdutor e transforme o sinal biológico ou químicas em um sinal elétrico. O sistema eletrônico consiste na quantificação dos sinais através de gráficos, por exemplo (Figura 4) (Grieshaber D *et al.*, 2008; Bhalla N *et al.*, 2016).

**Figura 4** – Elementos de um biossensor.



**Fonte:** Grieshaber *et al*, 2008.

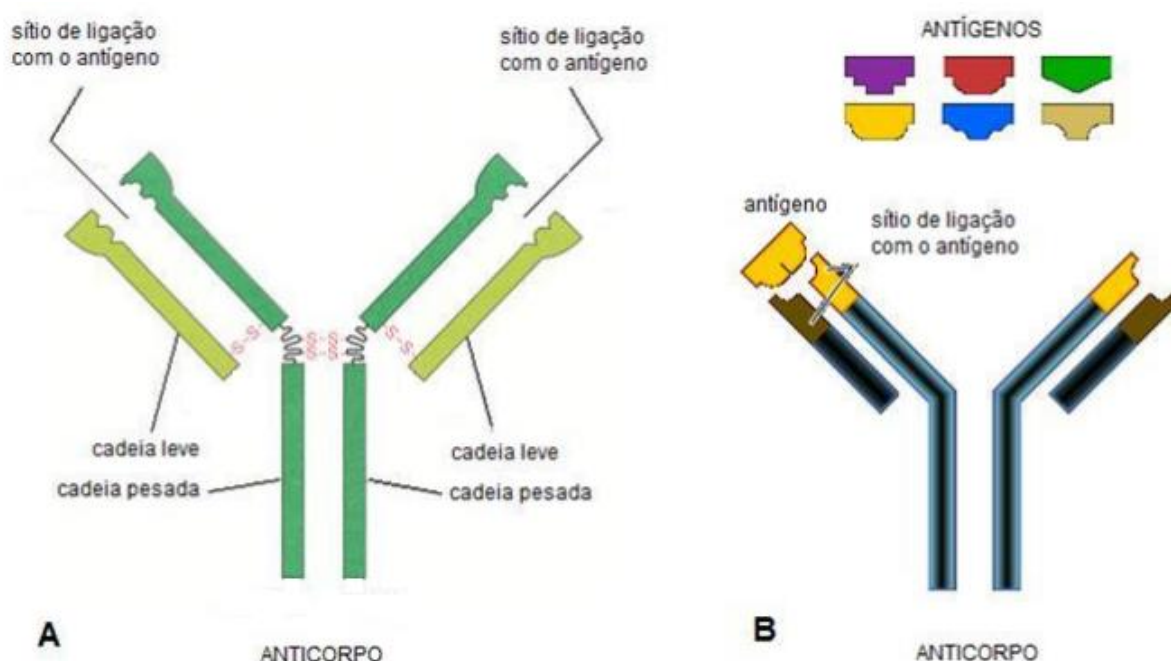
### 1.5.1 Biossensor eletroquímico

Os biossensores eletroquímicos podem ser classificados de acordo com a molécula a ser analisada e seu respectivo bioreceptor. Dessa forma, genossensores são biossensores que utilizam ácidos nucleicos ou fragmentos destes para detecção específica. Biossensores enzimáticos utilizam de enzimas como analitos alvo das amostras que realizam atividade específica sobre determinado composto. Biossensor microbiológico utilizam de fungos, bactérias, organelas animais ou vegetais, entre outros, como componente biológico de detecção. Finalmente, tem-se os imunossensores que utilizam da ligação entre antígenos e anticorpos que conferem bioreconhecimento e geração sinal a ser analisado posteriormente (Gomes MF, 2011; Ferreira AAP e Yamanaka H, 2006).

### 1.5.2 Imunossensores

Baseados na reação imunológica específica entre antígenos (Ag) e anticorpos (Ac). O princípio do imunossensor é a formação estável do complexo antígeno-anticorpo de bioreconhecimento, permitindo a construção de imunossensores específicos a diversas finalidades (Luppa PB, Sokoll LJ e Chan DW, 2001).

**Figura 5:** Representação da estrutura de um anticorpo



**Nota:** (A) Fab: fragmento que contém sítio de ligação com antígeno (cadeia leve); Fc: fração constante com função de regulação imunológica (cadeia pesada). (B) ligação específica formando complexo antígeno-anticorpo.

**Fonte:** Gomes MF, 2011 (adaptada).

Anticorpos são formados por glicoproteínas denominadas imunoglobulinas (Ig), que são produzidos, pelos linfócitos B, a partir de estímulos causados pela presença de compostos considerados nocivos pelo sistema imune, chamados de antígenos. Possuem estrutura química que torna possível a interação com os patógenos, possibilitando a neutralização do mesmo e posteriormente sendo fagocitado por macrófagos (Gomes MF, 2011). Os Ac são compostos por dois sítios (figura 5): porção variável (Fab), responsável pela ligação deste ao Ag, e porção cristalizável (Fc), responsável pela variação da classe de Ac. Para a correta ligação na superfície do eletrodo, a imobilização precisa ser realizada de forma criteriosa, com o intuito de manter a porção Fc imobilizada e a porção Fab livre para se ligar ao antígeno (Ferreira AAP e Yamanaka H, 2006).

#### **1.5.4 Imobilização de moléculas**

A imobilização das moléculas é extremamente importante para o desenvolvimento de um biossensor. Essa etapa tem como objetivo manter a biomolécula aderida ao eletrodo para aproveitamento de sua máxima atividade, garantindo estabilidade (Carneiro P, Morais S e Pereira MC, 2020). Diversos são os métodos utilizados para imobilização de moléculas na superfície do eletrodo, que são escolhidas de acordo com condições como: o analito e o bioreceptor, o transdutor e as condições operacionais para o desenvolvimento do sensor. Os métodos mais utilizados são a adsorção física, ligação covalente, ligação cruzada e aprisionamento (Mello LD e Kubota LT, 2002).

O método de adsorção ocorre por meio de forças de Van der Waals, pontes de hidrogênio, ligações iônicas e formação de sítios complexos de transferência de elétrons que ocorrem pela afinidade entre a molécula e a estrutura do sensor. Apresenta uma técnica vantajosa por ser de baixo custo, rápida, simples e apresentar menores danos a estrutura das moléculas. Porém, as forças podem ser influenciadas por alterações no meio (como pH, temperatura e força iônica), podendo acarretar em uma frágil união entre os elementos (D'Souza SF 2001).

#### **1.5.5 Eletrodos modificados**

A fim de melhorar a imobilização de moléculas, melhorar a transferência de elétrons e diminuir ligações inespecíficas de moléculas com características redox similares, têm-se utilizado a modificação da superfície dos eletrodos com materiais que apresentam diversas propriedades físico-químicas (Idris AO *et al.*, 2023).

#### 1.5.5.1 Eletrodos de grafeno

O grafeno é um nanomaterial bidimensional composto por átomos de carbono dispostos hexagonalmente, conferindo uma grande área de superfície, capaz de interagir com uma ampla gama de moléculas (Suvarnaphaet P, Pechprasarn S, 2017). Possui alta resistência mecânica, alta condutividade elétrica, alta elasticidade e condutividade térmica. Tais propriedades físicas e eletroquímicas despertaram o interesse em seu uso na construção de sensores e biossensores com uma ampla gama de aplicações (Justino CLL *et al.*, 2017).

Sensores e biossensores com grafeno em sua constituição já foram utilizados em diversas aplicações clínicas como na detecção de biomarcadores importantes, como glicose, peróxido de hidrogênio e biomarcadores de câncer (Bollella P *et al.*, 2017). No entanto, apesar do seu potencial promissor, suas propriedades ainda necessitam ser exploradas na construção de biossensores para diagnóstico de doenças.

#### 1.5.5.2 Eletrodeposição de ouro

A utilização de nanopartículas de ouro (AuNP's) para o desenvolvimento de biossensores apresentam grandes vantagens, pois eles possuem a capacidade de amplificar o sinal facilitando a transferência de elétrons, sendo muito utilizada em biossensores eletroquímicos. A eletrodeposição de ouro configura excelente condutividade elétrica, aumentando a transferência de elétrons e consequentemente melhorando a detecção. Também configuram aumento da área de superfície e melhorando os sítios de ligações de antígenos, por exemplo (Campos DAR *et al.*, 2022). A estabilidade também é um fator que pode ser melhorado devido ao uso do nanomaterial (Chiang HC *et al.*, 2019).

### 1.5.6 Antígeno purificado

A utilização de antígenos purificados pode trazer melhores resultados quando comparados à antígenos brutos. Pensando nisso, um estudo realizado por Figueiredo e colaboradores (2021) projetou uma nova proteína quimérica contendo epítomos expressos em espécies de *Leishmania* que causam a forma visceral da doença, chamada de DTL-4. Com o intuito de obter melhor especificidade e sensibilidade de resultados obtidos através do teste ELISA, foram testadas amostras de pacientes previamente positivos para a leishmaniose visceral como para outras doenças passíveis de reatividade cruzada.

Os resultados obtidos no estudo citado anteriormente foram muito promissores, já que a sensibilidade e especificidade no teste ELISA foram de 94,61% e 99,41% (Figueiredo MM *et*

al., 2021). Porém, algumas das limitações relacionadas ao teste ELISA já citadas neste trabalho permanecem. Dessa forma, um imunossensor eletroquímico que utilize o antígeno purificado DTL-4 para detecção da leishmaniose visceral mostra-se uma ferramenta muito promissora.

### 1.5.7 Técnicas eletroquímicas

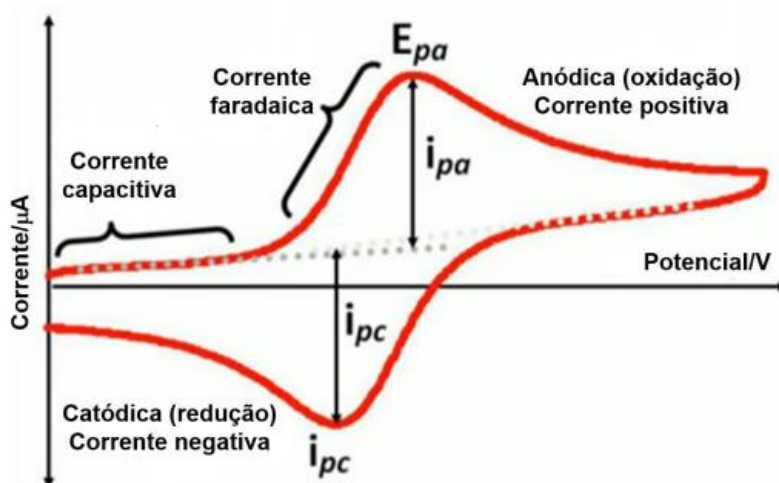
Técnicas eletroquímicas se baseiam nas reações de oxidação e redução em soluções eletrolíticas. Elas estudam as propriedades elétricas presentes nas células eletroquímicas, como potencial e corrente de determinado analito. Tais técnicas permitem a construção dos sensores com maior sensibilidade, rapidez e possibilidade de miniaturização (Barbieri GJLS 2017).

#### 1.5.7.1 Voltametria cíclica

A voltametria cíclica (VC) é a técnica mais utilizada para obter informações sobre o potencial de transferência de elétrons em reações redox (redução-oxidação) das soluções de um analito. A diferença de potencial (tensão) é medida em função do tempo entre o eletrodo de referência e o eletrodo de trabalho, enquanto a corrente é aferida entre o eletrodo de trabalho e o contra-eletrodo. Os valores obtidos são plotados em voltamogramas (Gosser DK 1994).

De início, o potencial negativo é aplicado, então nenhuma oxidação ocorre. Com o aumento do potencial para regiões anódicas (positivas) ocorre a oxidação do composto, de acordo com sua concentração gerando um pico de corrente, quando o potencial atingir um valor máximo (nenhuma oxidação ocorre). O potencial então é varrido no sentido inverso até o ponto inicial da reação, ocorrendo então a redução, gerando um pico simétrico ao de oxidação (figura 6). Nesse caso, a reação é reversível (Barbieri GJLS 2017).

Figura 6: Representação esquemática da técnica de voltametria cíclica.



Fonte: Barbieri GJLS, 2017.

## REFERÊNCIAS

- Akhoundi B, *et al.* Rapid detection of human *Leishmania infantum* infection: a comparative field study using the fast agglutination screening test and the direct agglutination test. **Travel medicine and infectious disease**. 2010; 8(5): 305-310. doi:10.1016/j.tmaid.2010.09.001
- Barbieri, GJLS. **Desenvolvimento de imunossensores eletroquímicos para detecção de aflatoxina B1 em alimentos**. 2017. [Tese]. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Universidade Federal do Pernambuco. Pernambuco, 2017. Acesso em: <https://repositorio.ufpe.br/bitstream/123456789/26626/1/TESE%20Gilcelia%20Janaina%20Lino%20da%20Silva%20Barbieri.pdf>. Acesso em: 14 jan 2024.
- Barrett MP, Croft SL. Management of trypanosomiasis and leishmaniasis. **Br Med Bull**. 2012; 104(1):175–196. doi:10.1093/bmb/lds031
- Bhalla, N *et al.* Introduction to biosensors. **Essays in biochemistry**. 2016; 60(1): 1-8. doi:10.1042/EBC20150001
- Bollella P *et al.* Beyond graphene: electrochemical sensors and biosensors for biomarkers detection. **Biosensors and Bioelectronics**. 2017; 89(1): 152-166. doi.org/10.1016/j.bios.2016.03.068
- BRASIL. Ministério da Saúde; Fundação Oswaldo Cruz. **IFI Leishmaniose Humana Bio-Manguinhos**. 2024. Disponível em: <https://www.bio.fiocruz.br/index.php/br/produtos/reativos/ensaios-sorologicos/imunofluorescencia-indireta/leishmaniose-humana#:~:text=%C3%89%20um%20teste%20de%20imunofluoresc%C3%Aancia,luz%20azul%20e%20ultra%20violeta>. Acesso em: 04 ago 2024.
- BRASIL. Ministério da Saúde; Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente. **Leishmaniose Visceral 2022**. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/leishmaniose-visceral/situacao-epidemiologica/publicacoes/lv-graficos-e-mapas.pdf>. Acesso em: 23 jan 2024.
- BRASIL. Ministério da Saúde; Sistema de Informação de Agravos de Notificação; Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente. **Casos confirmados de leishmaniose visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2021**. 2024. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/leishmaniose-visceral/situacao-epidemiologica/publicacoes/atualizacao-21-10-2022/lv-casos-2022.pdf/view>. Acesso em: 11 ago 2024.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Situação epidemiológica da Leishmaniose Visceral**. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/leishmaniose-visceral/situacao-epidemiologica-da-leishmaniose-visceral>. Acesso em: 15 fev 2024.
- Campos, DAR de. Biossensores Eletroquímicos Baseados em Peroxidase: Revisão. **Rev. Virtual Quim**. 2022: 1-20. doi:10.21577/1984-6835.20220127
- Carneiro P, Morais S, Pereira, MC. Biosensors on the road to early diagnostic and surveillance of Alzheimer's disease. **Talanta**. 2020; 1;211:120700. doi: 10.1016/j.talanta.2019.120700

Centers for Disease and Prevention Control. **Leishmaniasis**, 2024. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>>. Acesso em: 17 jul 2024

Cervantes-Landín, AY et al. High molecular weight proteins of *Trypanosoma cruzi* reduce cross-reaction with *Leishmania* spp. in serological diagnosis tests. **BioMed research international**. 2014; 2014: 365-403. doi:10.1155/2014/365403

Chiang, HC et al. Optimization of the Electrodeposition of Gold Nanoparticles for the Application of Highly Sensitive, Label-Free Biosensor. **Biosensors** 2019; 9(2) 50-61. doi:10.3390/bios9020050

D'Souza, S. F. Microbial biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**. 2001; 16 (6): 337–353. doi: 10.1016/s0956-5663(01)00125-7

Elmahallawy, EK *et al.* Diagnosis of leishmaniasis. **Journal of infection in developing countries**. 2014; 8(8): 961-972. doi:10.3855/jidc.4310

Ferreira AAP; Yamanaka H. Microscopia de força atômica aplicada em imunoensaios. **Quím. Nova**. 2006; 29 (1): 137-142. doi:10.1590/S0100-40422006000100024

Figueiredo, MM *et al.* Improved Performance of ELISA and Immunochromatographic Tests Using a New Chimeric A2-Based Protein for Human Visceral Leishmaniasis Diagnosis. **Journal of immunology research**. 2021; 5568077. doi:10.1155/2021/5568077

Freire, ML et al. Performance of serological tests available in Brazil for the diagnosis of human visceral leishmaniasis. **PLoS neglected tropical diseases**. 2019; 13(7): e0007484 doi:10.1371/journal.pntd.0007484

Ghorbani M, Farhoudi R. Leishmaniasis in humans: drug or vaccine therapy?. **Drug Des Devel Ther**. 2017; 12:25-40. doi:10.2147/DDDT.S146521

Gomes, MF. **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. [Dissertação]. Instituto de Química. Programa de Pós Graduação em Química. Uberlândia, 2011. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/17337/1/Diss%20Miqueias.pdf>. Acesso em 18 jan 2024

Gosser, DK. Cyclic Voltammetry, Simulation and Analysis of Reaction Mechanisms. **VHC Publishers, Inc.** 1994. New York, 1994

GRIESHABER, D *et al.* Electrochemical Biosensors: Sensor Principles and Architectures. **Sensors (Basel, Switzerland)**. 2008; 8 (3): 1400-1458. doi:10.3390/s80314000

Hailu, A *et al.* Field evaluation of a fast anti-*Leishmania* antibody detection assay in Ethiopia. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. 2006; 100(1): 48-52. doi:10.1016/j.trstmh.2005.07.003

Hide, M *et al.* A microculture technique for isolating live *Leishmania* parasites from peripheral blood of visceral leishmaniasis patients. **Acta tropica**. 2007; 102(3): 197-200. doi:10.1016/j.actatropica.2007.04.015

Hosseini FBR *et al.* The rK39 Antigen from an Iranian Strain of *Leishmania infantum*: Detection of Anti-*Leishmania* Antibodies in Humans and Dogs. **Iran J Parasitol.** 2020; 15(1):48-56. PMID: 32489375; PMCID: PMC7244836

Idris, AO *et al.* Using Nanomaterials as Excellent Immobilisation Layer for Biosensor Design. **Biosensors.** 2023; 13(2): 192. doi:10.3390/bios13020192

Justino CIL *et al.* Graphene based sensors and biosensors. **TrAC Trends in Analytical Chemistry.** 2017;91: 53-66. doi:10.1016/j.trac.2017.04.003

Lachaud, L *et al.* Optimized PCR using patient blood samples for diagnosis and follow-up of visceral Leishmaniasis, with special reference to AIDS patients. **Journal of clinical microbiology.** 2000; 38(1): 236-40. doi:10.1128/JCM.38.1.236-240.2000

Luppa PB, Sokoll LJ, Chan DW. Immunosensors--principles and applications to clinical chemistry. **Clin Chim Acta.** 2001;314(1-2):1-26. doi:10.1016/s0009-8981(01)00629-5

Matos HJ *et al.* Reação cruzada nos testes sorológicos entre doença de Chagas e leishmaniose visceral em regiões endêmicas para ambas as doenças. **Rev Pan-Amaz Saude.** 2015; 6(1): 65-68. DOI: 10.5123/S2176-62232015000100007

Mello, LD, Kubota, LT. Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. **Food Chemistry.** 2002; 77(2): 237- 256. doi:10.1016/S0308-8146(02)00104-8

Mondal S, Bhattacharya P, Ali N. Current diagnosis and treatment of visceral leishmaniasis. **Expert Rev Anti-infect Ther.** 2010. 8(8):919–944. doi:10.1586/eri.10.78

Okwor I, Uzonna JE. Social and economic burden of human leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg.** 2016. 94(3): 489-93. doi:10.4269/ajtmh.15-0408

Organização Pan-Americana de Saúde. **Diretrizes para o tratamento das leishmanioses na Região das Américas: Segunda edição.** 2022. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/56487>. Acesso em: 19 jan 2024.

Piyasiri, SB *et al.* ELISA-based evaluation of antibody response to *Leishmania* in a region endemic for cutaneous leishmaniasis. **Parasite immunology.** 2022; 44(9): e12940. doi:10.1111/pim.12940

Ravindran R *et al.* Characterization of immunoglobulin G & its subclass response to Indian kala-azar infection before and after chemotherapy. **Infect Immun.** 2004; 72(2): 863-870. doi: 10.1128/IAI.72.2.863-870.2004

Sanchez, MCA *et al.* Performance of rK39-based immunochromatographic rapid diagnostic test for serodiagnosis of visceral leishmaniasis using whole blood, serum and oral fluid. **PloS one.** 2020; 15(4): e0230610. doi:10.1371/journal.pone.0230610

Schoone, GJ *et al.* A fast agglutination screening test (FAST) for the detection of anti-*Leishmania* antibodies. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.** 2001; 95(4): 400. doi:10.1016/s0035-9203(01)90196-8

Shahbazi, F *et al.* Evaluation of PCR assay in diagnosis and identification of cutaneous leishmaniasis: a comparison with the parasitological methods. **Parasitology research**. 2008; 103(5): 1159-62. doi:10.1007/s00436-008-1111-4.0

Suvarnaphaet P; Pechprasarn S. Graphene-based materials for biosensors: a review. **Sensors**. 2017;21(17): 1-10. doi: 10.3390/s17102161

Silva, GJL. **Desenvolvimento de um sensor impedimétrico para detecção de *Penicillium sclerotigenum* baseado no compósito Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-hidroclorato de poli(alilamina)**. 2013. [Dissertação]. Curso de Pós Graduação em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2013.

Srivastava P *et al.* Diagnosis of visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. 2011;105(1):1-6. doi:10.1016/j.trstmh.2010.09.006

Steverding, D. The history of leishmaniasis. **Parasit Vectors**. 2017;10(1):82. doi:10.1186/s13071-017-2028-5

Thakur S, Joshi J, Kaur S. Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of parasitological, immunological and molecular methods. **J Parasit Dis**. 2020;44(2):253-272. doi:10.1007/s12639-020-01212-w

Van Griensven J, Diro, E. Visceral Leishmaniasis: Recent Advances in Diagnostics and Treatment Regimens. **Infect Dis Clin North Am**. 2019;33(1):79-99. DOI: 10.1016/j.idc.2018.10.005

World Health Organization. **Leishmaniasis**. 2024. Disponível em: [https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1). Acesso em 28 mar 2024.

## APÊNDICE A – ARTIGO EM INGLÊS



**Nanomedicine & Nanotechnology Open Access**  
ISSN: 2574-187X

## Development of a pioneering electrochemical immunosensor for accurate detection of human visceral leishmaniasis with purified *Leishmania spp.* recombinant antigen

**Severino LB<sub>1</sub>\*, Martins BR<sub>1,6</sub>\*, Andrade CMR<sub>1,6</sub>, Martins RDP<sub>2</sub>, Simao GF<sub>3</sub>, Lima AB<sub>3</sub>, Rodrigues V<sub>1,6</sub>, Fernandes AP<sub>4</sub> and Alves RP<sub>5</sub>**

1 Laboratory of Immunology, Federal University of Triângulo Mineiro, Brazil

2 Postgraduate Program in Physiological Sciences, Federal University of Triângulo Mineiro, Brazil

3 Master in Materials Sciences and Technologies, Federal University of Triângulo Mineiro, Brazil

4 Department of Clinical and Toxicological Analysis, Federal University of Minas Gerais, Brazil

5 Federal University of Triângulo Mineiro, Brazil

6 INCT-Neuroimmune Modulation, Brazil

**\*Corresponding author:** Dra Renata Pereira Alves, Laboratory of Immunology, Federal University of Triângulo Mineiro, Uberaba, Minas Gerais, 38025-350, INCT-Neuroimmune Modulation, Brazil, Email: [renata.pereira@uftm.edu.br](mailto:renata.pereira@uftm.edu.br)

#Equally contributed towards this article

Research Article

Volume 9 Issue 4

Received Date: September 18, 2024

Published Date: October 24, 2024

DOI: 10.23880/nnoa-16000324

### Abstract

Leishmaniasis is a disease that affects a large part of the population of Latin America, especially in Brazil. It has a high mortality rate if left untreated. The main diagnostic methods currently used are based on signs and symptoms suggestive associated with parasitological and/or immunological tests, however, such tests have disadvantages such as low sensitivity and specificity, high cost, need for equipped laboratories and qualified professionals. Thus, it is necessary to have a fast, accurate, low-cost, portable diagnosis that has good sensitivity and specificity. In this study, a recombinant antigen (Ag) called DTL-4 was used because of its potential to improve the sensitivity and specificity of the tests because it only allows specific binding with the antibody in the serum of patients with the disease. The results of the proposed immunosensor showed an estimated detection limit of 0.0442 ng mL<sup>-1</sup>. The absence of modifications with gold nanoparticles is another interesting point when we compare the cost related to the biosensor in

question with other diagnostic methods. Thus, the proposed immunosensor has low cost, high specificity and sensitivity. In this way, the biosensor in question shows promise for validating the diagnostic platform and its future portable use in public health.

**Keywords:** Immunosensor, Human Visceral Leishmaniasis, Recombinant Antigen, Serum, Electrochemical.

## 1. Introduction:

Leishmaniasis is the term designated to identify an infectious disease caused by the flagellated protozoan called *Leishmania spp.*, transmitted through the bite of the contaminated female mosquito, popularly known as "sand fly" (subfamily *Phlebotominae* and genus *Lutzomyia*). The disease may present clinical manifestations related to the cutaneous or visceral forms [1, 2].

According to the Brazilian Ministry of Health (2022) [3], currently, at least 76 countries are endemic for visceral leishmaniasis, with an equivalent of 200-400 thousand new cases annually, where approximately 95% of infected patients diagnosed late die from poor countries that have difficulties in early diagnosis and effective treatment of sick communities. In this sense, Brazil becomes a country of alert, since it has an average of 3,500 new cases annually and represents about 90% of the new cases that affect Latin America and the Caribbean, this rate becomes even more serious for the country's socially vulnerable populations [4, 5], thus, these data point to the relevance of prevention and control policies for this disease in the country.

The primary prevention strategies to mitigate transmission via vectors proposed by the World Health Organization in 2023 [6], include that in endemic areas, vector control, management of vertebrate hosts considered reservoirs, diagnosis and immediate treatment of the sick should occur, thus, these measures together can bring immeasurable benefits to individuals positive for the disease. Regarding the efficiency and economy of public expenditures for infectious diseases, vaccination represents an interesting strategy, however, for human visceral leishmaniasis, this methodology cannot yet be used due to the challenges faced in the production and standardization of these immunizers [7]. In this way, early diagnosis and treatment, personalized to the reality of the patient and the national health system, become even more relevant.

The diagnosis of leishmaniasis is made by evaluating clinical signs and symptoms suggestive of the disease, which will be confirmed by immunological and/or parasitological laboratory tests. In Brazil,

rapid immunochromatographic tests, indirect immunofluorescence (IFA), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and molecular tests are commonly performed [6, 8, 9, 10, 11].

However, many tests vary in sensitivity and specificity depending on the parasite, type of sample performed, and region of the country, may present results contrary to the actual diagnosis, also making it difficult to perform the diagnosis in the field [9, 12, 13,]. In this study, the construction of a method for the diagnosis of visceral leishmaniasis (VL) was initiated through the evaluation of patients on a platform sensitized with purified antigens of the parasite.

As a way to improve the diagnostic possibility for leishmaniasis and reduce cross-reactive events with other pathologies, a study demonstrated the use of purified antigens consisting of chimeric proteins DTL-4 in ELISA tests [14].

To improve the response and sensitivity of biosensors, carbon-based nanomaterials have been used. Nanomaterials have been used to compose diagnostic platforms because they have unique chemical, optical and electrical properties. [15, 16]. An example of a carbon-based nanomaterial that has been much studied in recent times is graphene. Graphene is a two-dimensional nanomaterial composed of hexagonally arranged carbon atoms, giving it a large surface area, capable of interacting with a wide range of molecules [17]. It has high mechanical strength, high electrical conductivity, high elasticity and thermal conductivity. Such physical and electrochemical properties have sparked interest in its use in the construction of sensors and biosensors with a wide range of applications [18].

Biosensors with graphene in their constitution have already been used in several clinical applications such as the detection of important biomarkers, such as glucose, hydrogen peroxide, and cancer biomarkers [19].

Thus, in this search for new diagnostic processes that are fast and accurate at the point of care of this disease, electrochemical biosensors are promising diagnostic tools [20, 21, 22]. In this study, we demonstrated that the application of immunosensors contributes significantly to the diagnostic accuracy of human visceral leishmaniasis and represents an important tool for epidemiological monitoring and control of the spread of this endemic. Thus, it can be considered a tool with the potential to face the challenges and goals associated with the fight and control of this disease, as proposed by the World Health Organization.

## 2. Materials and methods

### 2.1 Reagents and biomolecules

The solutions were previously diluted in ultrapure water (Mili Q). Potassium ferri/ferrocyanide solution ( $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) 5mM, containing 0.1M KCl, pH 7.4, (LabSynth, Brazil) was prepared before use in all experiments, as well as potassium chloride (KCl), at a concentration of 0.1M in order to activate and reduce the electrode surface. Gold chloride was dissolved in sulfuric acid ( $1\text{g L}^{-1} \text{AuCl}_3$  in 10 mL of 1M sulfuric acid) for modification on the surface of the electrodes. After the modification with gold, a 1M sulfuric acid solution was used for electrochemical cleaning.

The purified DTL-4 antigen was kindly provided and is still under patent deposit [23]. It was reserved in aliquots at a standardized concentration of 10 ng/mL, diluted and frozen at  $-80^\circ\text{C}$ . At each new test, a new aliquot was used. The 0.1% BSA solution was used to block the electrode surface, and thus prevent the coupling of other biomolecules.

The serum of the patients was used in concentrations that will be addressed throughout the work. All experiments were made at room temperature ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ). Electrochemical tests were performed using the equipment Em Stat 1 (PalmSens BV, The Netherlands). The serum samples used were submitted to the CEP (Research Ethics Committee) by Plataforma Brasil. Leishmania serum has CAAE 58301516.8.0000.5154. Chagas serum has CAAE 64048117.3.0000.5154. In addition to the positive samples for leishmaniasis and Chagas, a negative sample CAAE: 59831016.2.0000.5154 (Opinion No.: 1.870.741) was also used ( $n = 3$ ).

### 2.2 Devices

Graphite (DPR-110) and graphene (DRP-110GPH) screen-printed electrodes from Dropens, Asturias, Spain, were used for the electrochemical platform. These consist of a ceramic strip containing a system of three electrodes (working, counter and reference electrodes) for a single drop analysis.

Electrochemical analyses were performed by cyclic voltammetry ( $100 \text{ mV s}^{-1}$ ) using Em Stat 1 equipment (PalmSens BV, Netherlands) connected to a notebook.

For ELISA tests (EnSpire/PerkinElmer), optical density (OD) values were determined in a microtiter plate reader at 490 nm. To prepare the table graphs, the Origin 2019 program (OriginLab, United Kingdom) was used.

### 2.3 Indirect ELISA

For the detection of immunoglobulin G (IgG) antibodies against leishmania, we used the indirect ELISA test with high-affinity plates (Thermo Scientific Tm Nunc Tm, Waltham, MA, USA), sensitized with antigens ( $0.25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), diluted in 0.06M carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.6) and incubated for 18 hours at 4°C. The plates were washed 3 times with phosphate buffered saline (PBS) containing 0.05% Tween 20 (PBS-T) and blocked with PBS containing 5% skimmed milk powder (Molico, Nestlé, São Paulo, Brazil – PB-M5%) for 4 hours at room temperature. Performed again 3 washes of the plate and diluted sera (1:100) in 5% PB-M and incubated for 18 hours at 4°C.

Performed 6 washes and added anti-human IgG antibody (1:1000) conjugated to peroxidase (IgG/horseradish peroxidase (HRP), Dako) and incubated for 2 hours at room temperature. After washing the plates again 6 times, the reaction developed by adding the substrate 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (Scienco Biotech LTDA, Brazil) and stopping the reaction with  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1M. Positive and negative controls were included on the board. Antibody levels were expressed in ELISA, according to the following formula:  $\text{EI} = \text{Abs sample} / \text{cut off point}$ , where the cut off point is calculated as the mean Abs of the negative control serum plus three standard deviations. EI values > 1.2 were considered positive.

### 2.4 Electrochemical Modifications

The electrodes were initially used without any previous modification. After the tests, they were subjected to electrodeposition of gold nanoparticles for 20 voltammetric cycles in gold chloride ( $\text{HauCl}_4$ ,  $1 \text{ g L}^{-1}$ ) prepared in a 1M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  solution in the potential range between +0.3 and +1.0 V vs pseudo Ag at the scan rate of  $0.1 \text{ V s}^{-1}$ . After the process, it is possible to notice the color change caused by the electrodeposition of the gold nanoparticles. The modified electrode was cleaned for 5 cycles in a solution of  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1M to eliminate any non-electrodeposited particles that may hinder the adsorption of molecules.

## 2.5 Immunosensor

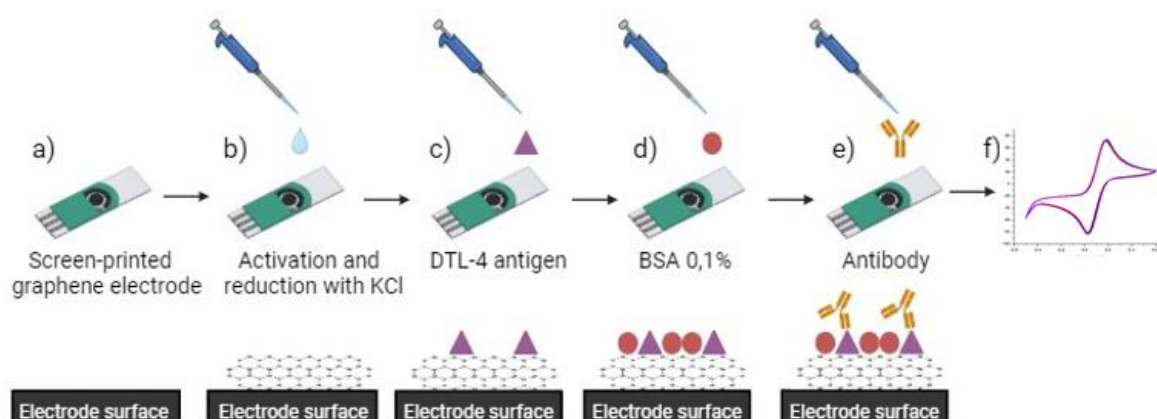
For the development of the immunosensor, it was necessary to immobilize 4  $\mu\text{L}$  the purified DTL-4 antigen on the surface of the working electrode (graphite, graphite modified with gold and graphene and graphene modified with gold) by drop-casting. The drying time between each process was standardized before they occurred at room temperature for 20 minutes. After drying, the electrodes were washed with 80  $\mu\text{L}$  of water Mili Q and the electrode was spontaneously dried at room temperature. In order to avoid nonspecific binding, 4  $\mu\text{L}$  of 0.1% bovine serum albumin (BSA) was added as a blocking solution. In the end, the serum was made available. Again, the electrodes were washed and dried spontaneously at room temperature. To evaluate the immobilization of the antigen in each working electrode, 80  $\mu\text{L}$  of potassium ferri/ferrocyanide solution ( $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ ) (5 mM) was used as a redox probe indicator.

## 2.6 Specificity

An aliquot of 4  $\mu\text{L}$  of serum positive for Chagas disease (1:500) was pipetted into the immunosensor and kept at room temperature for drying. Subsequently, a final wash with ultrapure water was performed, and the electrode was dried spontaneously. The same protocol was performed with positive serum for leishmaniasis (1:500) and, in a third electrode, performed with negative serum (1:500). In all tests, including triplicates, changes in the electrochemical signals of  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$  (5 mM) were evaluated (scan speed: 100  $\text{mV s}^{-1}$ ).

## 2.7 Calibration Curve

To validate the sensitivity of the immunosensor, 4  $\mu\text{L}$  of serum were added at different concentrations (1:100, 1:500, 1:5,000, 1:10,000 and 1:100,000). Incubation was carried out under the same conditions as before (drying time of 20 minutes at a temperature of  $25 \pm 1^\circ \text{C}$ ).



**Figure 1:** Representative image of the electrochemical immunosensor developed using commercial screen printed electrodes with graphene (DPR-110-GPH). The preparation steps of the immunosensors are as follows: (a) the commercial carbon electrode was used as the base platform; (b) Activation and reduction with KCl (c) after material modifications, the gross antigen of DTL-4 was immobilized in modified surface of the electrodes; (d) for blocking nonspecific interactions, a 0,1 % bovine serum albumin (BSA) blocking solution was coupled to the platform; (e) after preparations, the antibodies were coupled (real sample/serum); and (f) finally, the electroanalytic solution was inserted, and the process of transduction was started; thus, the surface with the antigen probe was autonomized as presented in a cyclic voltammetry (CV). For the evaluation of chemical modifications performed on the surface of the electrodes

## 2.8 Statistical analysis

The statistical analyses were based on the construction of column plots through the percentages of the oxidation and reduction current of the redox probe obtained by cyclic voltammetry, calculated in relation to the initial cyclic voltammetry (only absorption of the DTL-4 antigen). Thus, a drop in the percentage of current indicates an increase in the coupling of the biomolecules on the surface of the electrode.

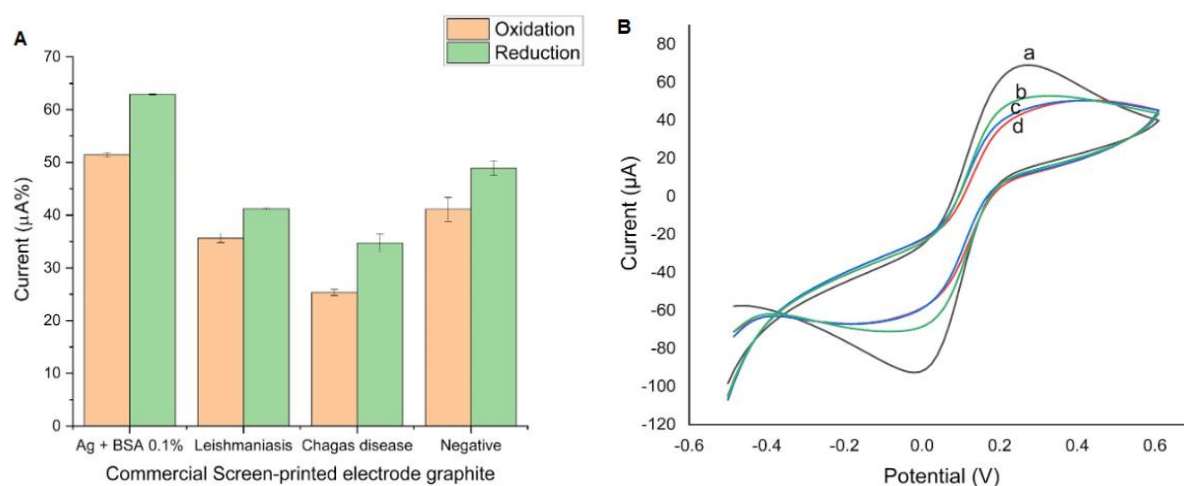
## 3. Results and discussions

The evaluation of the peak current occurred in cyclic voltammetry, considering the different interactions that occur between the electrode surface and the biomolecules, presenting a bar graph and its voltammetry, using electrodes of: graphite, graphite modified with gold, graphene and graphene modified with gold.

The initial peak current of oxidation and reduction, which we call the platform, consists of the voltammetry performed with potassium ferri/ferrocyanide by the electrode adsorbed with the purified antigen DTL-4. This platform is then compared with new current peaks when the electrode already has antibody coupling present in the tested sera (Leishmaniasis/positive control, Chagas disease and negative control).

To consider whether there was coupling of the antibodies with the DTL-4 antigen already adsorbed on the surface of the electrode, we observed a drop in peak current. Because when there is coupling, the surface through which the current will travel is more resistive, in this way, the fall of the current is observed (surface becomes less conductive). In order for the results to be better visualized, bar graphs were developed and the results obtained through the tests carried out with graphite and graphene electrodes and their respective modifications with gold nanoparticles were compared.

In figure 2A we can see the results of the tests with graphite electrode in the form of a bar graph and in figure 2B the cyclic voltammetry. It is possible to identify that all patients (Leishmaniasis, Chagas disease and negative control) performed coupling with the adsorbed antigen, that is, all tests were positive, demonstrating that this platform presented cross-reaction (Chagas serum presented the greatest drop in current). This fosters the idea that in tests with the antigen in question, in order to improve the specificity of the results, it is necessary to make modifications to the surface of the electrode.

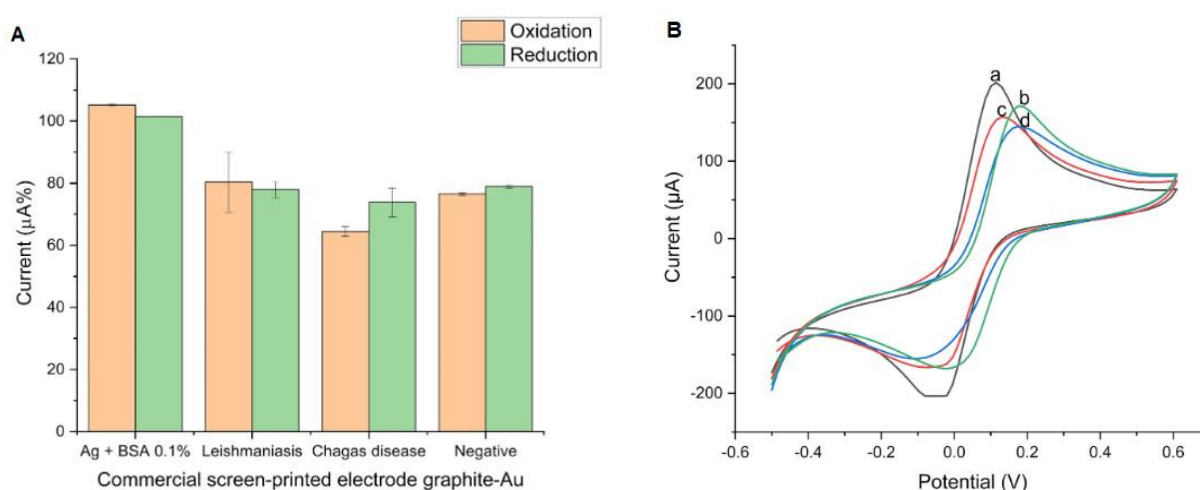


**Figure 2:** Bar graphs representing data referring to the detection graph (A) and cyclic voltammograms (B) for de redox probe in graphite electrodes.

We emphasize that in the "first bar" we represent the electrochemical platform constituted by a surface modified with biomolecules, such as BSA (bovine serum albumin) and DTL-4, in this case the BSA acts as a blocking layer, while the antigen serves as a recognition site for the analyte. In the following pairs of bars we represent the analyte, in this case, the serum (Leishmaniasis, Chagas disease and negative control), which binds to the antigen on the surface of the electrochemical platform, triggering a measurable electrochemical response, this response is used to detect and quantify the presence of the antibody in the tested sample. The error bars represent the mean and standard deviation (SD) of the triplicate measurements for each experimental condition. In cyclic voltammetry, the voltammogram is represented

to the deposition of DTL-4 and BSA 0.1% (a), deposition of serum from the negative control (b), deposition of chagasic serum (c), and deposition of positive serum for visceral leishmaniasis (d).

After the results obtained with the graphite electrode, we modified the electrodes with gold nanoparticles (Figure 3). We can observe that even after the modification, all the sera showed a significant drop in the current, again positive for the samples used. In addition, Chagas still has a greater range of detection. This explains that the modification of the electrode is not the solution to improve the specificity of the results, but the base material used to compose the electrode. Thus, we can infer that graphite interacts with all the biomolecules analyzed. It even causes cross-reaction as shown in figure 3A in column graphs and 3B in voltamograms. We can observe a cut in the reduction peak (a) due to an increase in conductivity. In any case, the peak analyzed was in oxidation.



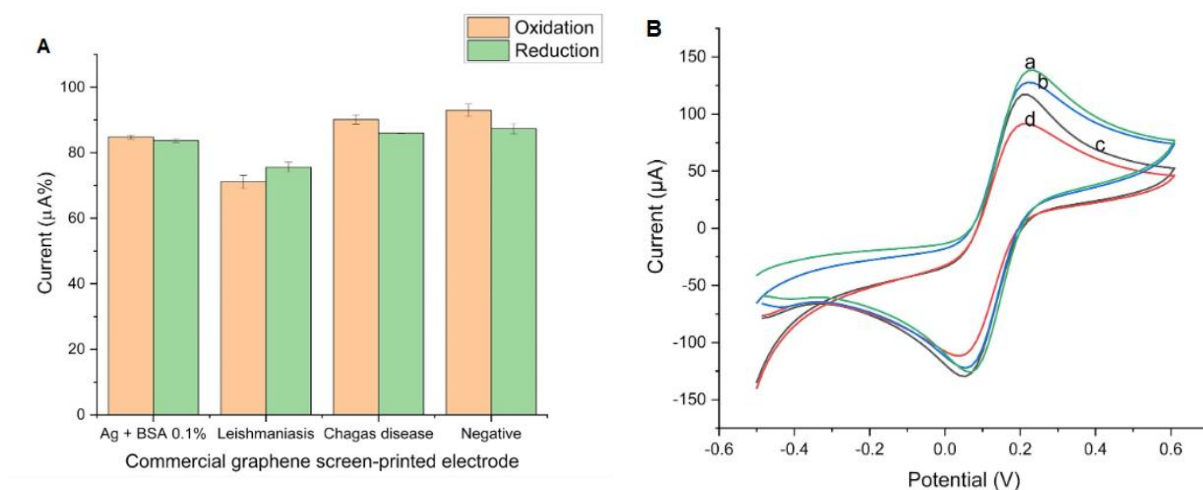
**Figure 3:** Bar graphs representing data referring to the detection graph (A) and cyclic voltammograms (B) for de redox probe in gold-modified graphite electrodes.

We emphasize that in the "first bar" we represent the electrochemical platform constituted by a surface modified with biomolecules, such as BSA (bovine serum albumin) and DTL-4, in this case the BSA acts as a blocking layer, while the antigen serves as a recognition site for the analyte. In the following pairs of bars we represent the analyte, in this case, the serum (Leishmaniasis, Chagas disease and negative control), which binds to the antigen on the surface of the electrochemical platform, triggering a measurable electrochemical response, this response is used to detect and quantify the presence of the antibody in the tested sample. The error bars represent the mean and standard deviation (SD) of the triplicate measurements for each experimental condition. In cyclic voltammetry, the voltammogram is represented

to the deposition of DTL-4 and BSA 0.1% (a), deposition of positive serum for visceral leishmaniasis (b), deposition of serum from the negative control (c), and deposition of chagasic serum (d).

Thus, according to the previous tests, we decided to use graphene as a base to compose the electrode (Figure 4). The tests performed with graphene electrodes showed better specificity when compared to the graphite electrode. By analyzing the bar graph (Figure 4A), we can identify the drop in current in the electrodes to which anti-leishmania antibodies were coupled, making the patient positive. We can also observe that the other sera (Chagas disease and negative) did not suffer a drop in the current, and these tests were then without cross-reaction and considered negative. Another factor that we can observe is that the tests carried out with chagasic serum and negative tests had an increase in peak current. This shows that in addition to not coupling to the antigen, there was dissociation from the probes already adsorbed on the platform.

The better performance presented by graphene in relation to graphite can be justified by the fact that its surface area is hundreds of times larger. The surface area of graphene is  $2600\text{m}^2/\text{g}$ , while the surface area of graphite is  $10\text{m}^2/\text{g}$  [24].



**Figure 4:** Bar graphs representing data referring to the detection graph (A) and cyclic voltammograms (B) for de redox probe in graphene electrodes.

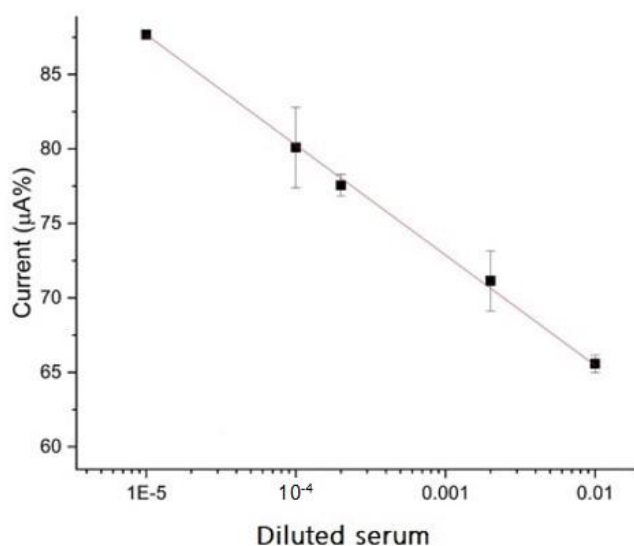
We emphasize that in the "first bar" we represent the electrochemical platform constituted by a surface modified with biomolecules, such as BSA (bovine serum albumin) and DTL-4, in this case the BSA acts as a blocking layer, while the antigen serves as a recognition site for the analyte. In the following pairs of bars we represent the analyte, in this case, the serum (Leishmaniasis, Chagas disease and negative control), which binds to the antigen on the surface of the electrochemical platform, triggering a measurable

electrochemical response, this response is used to detect and quantify the presence of the antibody in the tested sample. The error bars represent the mean and standard deviation (SD) of the triplicate measurements for each experimental condition. In cyclic voltammetry, the voltammogram is represented to the deposition of serum from the negative control (a), deposition of chagasic serum (b), DTL-4 and BSA 0.1% (c), and deposition of positive serum for visceral leishmaniasis (d).

Modification was also carried out with gold nanoparticles on the graphene electrode (results not shown), where we can observe that none of the samples suffered a significant drop in the peak, either in oxidation or reduction. That is, all tests were negative, where Chagas Disease was the one with the lowest detection.

### 3.3 Calibration Curve

The results obtained from the tests performed for the calibration curve are shown in Figure 6. Graphene electrode without modifications, following the methodology and results shown in figure 4, different concentrations of the sera were analyzed (1:100, 1:500, 1:5000, 1:10,000 and 1:100,000) and show inversely proportional results, because the less diluted the samples, the better the detections.



**Figure 5:** 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.

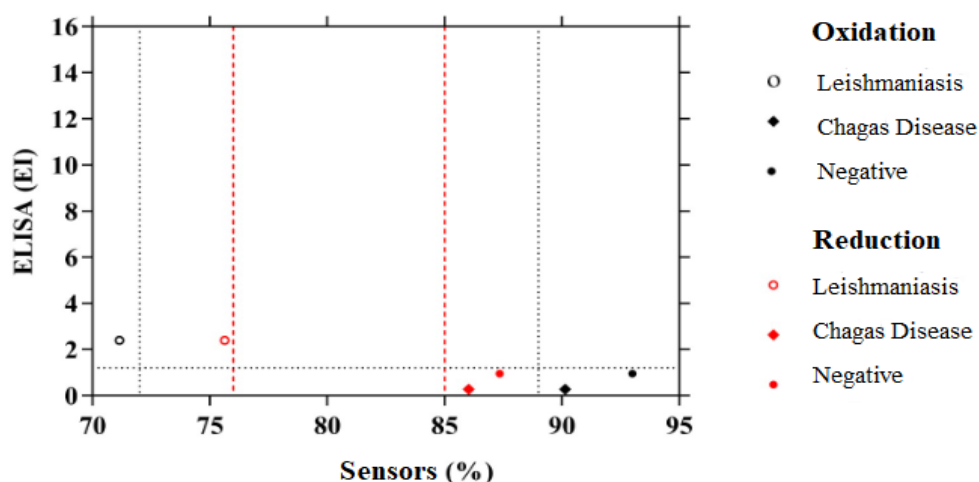
We used diluted serum at 1:100, 1:500, 1:5000, 1:10000, and 1:100,000 ratios. Higher dilutions did not generate linearity on the results (tests performed in triplicates). This plot presents the correlation coefficient of 0.999 (for the equation:  $i(\%) = -7.397 \times [\text{serum dilution ratio}] + 50.677$ ), an estimated limit

of detection of  $0.0442 \text{ ng mL}^{-1}$ , and limit of quantification of  $0.442 \text{ ng mL}^{-1}$ . 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, it was possible to observe that there was reactivity and absence of specification. The choice of graphene 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 capable of promoting reactivity. Given the results, the screen-printed graphene 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 [20].

### 3.4 Comparison with ELISA

To validate the samples that would be tested in the immunosensor developed in this study, the indirect ELISA test was performed. As reported in another study, the use of this recombinant protein does not cross-react with other trypanosomatids (such as Chagas disease) [14]. The results for indirect ELISA indicate high specificity when DTL-4 antigen is used. Figure 7 shows the EI values and the percentage current obtained by the proposed immunosensor obtained for the same serum samples (Leishmaniasis, Chagas disease and negative control). We found that the proposed biosensor also does not present cross-reaction. In the detection of leishmaniasis, there is a strong interaction between the purified antigen of visceral leishmaniasis and the anti-*Leishmania infantum* antibody, a result that converges with what is expected in theory. Both techniques were able to differentiate the Leishmaniasis serum from the others, demonstrating high specificity. In any case, the ELISA test has numerous disadvantages related to cost, it is an expensive technique that requires equipped laboratories, qualified professionals and cannot be performed in the field, making diagnosis difficult in endemic areas and in populations with difficult access to health care.



**Figure 6:** Correlation graph between results from electrochemical sensors (x-axis) and ELISA results (y-axis), where we can observe visceral leishmaniasis, Chagas disease and negative.

ELISA index (EI) values obtained by indirect ELISA with a line in  $EI > 1.2$  to guide the reader, for serum samples from Leishmaniasis, Chagas disease and negative control patients. Values below the black dotted line are considered negative sera, while values above the black dotted line indicate positive tests for the ELISA test. And the red line delimits the range of electrochemical detection where we observe better detection at peak oxidation for the tests, and the reduction even with lower sensitivity also does not allow cross-reaction.

According to Martins et al (2024) [22], modifications with graphene increase the sensitivity of the electrochemical detection system. However, when working with crude antigens, the researchers needed to add modifications with gold nanoparticles to ensure immobilization. In this study, additional modification was not necessary because the purified antigen correctly adsorbed on the graphene sheets and left the recognition epitope free for specific coupling.

According to Alves-Balvedi (2014 - 2015) [25, 26] the graphite electrode has many irregularities and may need modifications such as polymeric films, which may be one of the reasons for the limitation for the construction of the sensor with DTL-4.

#### 4. Conclusion

According to the results, we conclude that the immunosensor using graphene electrodes was efficient in immobilizing the DTL-4 antigen, generating better results when compared to graphite, graphite with gold and graphene electrodes with gold. The presence of the DTL-4 antigen in this platform allowed the specific

recognition of antibodies present in the serum of patients with visceral leishmaniasis. We also emphasize that the absence of gold modification in the proposed immunosensor is of great importance to make the sensor more advantageous in relation to its cost.

Leishmaniasis is a disease with the potential to cause death in more than 90% of cases when left untreated. Thus, a standardized, low-cost, and accessible diagnostic method is necessary, because the sooner the disease is diagnosed, early treatment can be started and thus, the prognosis becomes more favorable, enabling a cure. In countries where the disease is prevalent and with a large number of cases in rural areas, tools for rapid and accurate diagnosis of the disease are necessary for field use.

The objective of this work is to improve the tests and develop a diagnostic method that can be used in public health, improving the obstacles to early diagnosis of visceral leishmaniasis. Being more specific in relation to other methods, more practical and financially advantageous in relation to the ELISA test. Future studies will be conducted to evaluate the period of platform stability and its reproducibility in other patients. Thus, the proposed immunosensor shows promise in a future commercial use.

## **5. Acknowledgments**

We are grateful to the Pro-Rectorate 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 thank the funding agencies Research Foundation of the State of Minas Gerais (FAPEMIG), the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), and the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES).

## **6. Conflict of interest**

The authors declare no conflict of interest.

## **7. Data availability**

The data that has been used is confidential.

## **8. References**

- [1] Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern. Centers for Disease and Prevention Control (2017) Leishmaniasis. Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern. [Online]. Available: <https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>. [Accessed: Dec. 15, 2024].
- [2] Van-Griensven J, Diro E (2019) Visceral Leishmaniasis: Recent Advances in Diagnostics and Treatment Regimens. *Infectious Disease Clinics of North America*, 33 (1): 79-99.

- [3] Brasil. Ministério da Saúde, “Situação epidemiológica da Leishmaniose Visceral”, Ministério da Saúde, 2022. [Online]. Available: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/leishmaniose-visceral/situacao-epidemiologica-da-leishmaniose-visceral>. [Accessed: Dec. 22, 2023].
- [4] Oliveira VJ, Siqueira AB, Vieira CS, Fonseca SLS (2022) Epidemiologia da leishmaniose visceral humana no Brasil: perspectivas da atenção à saúde pública pelo prisma da Medicina Veterinária. *Research, Society and Development* 11(15): 1-15.
- [5] Okwor I, Uzonna JE (2016) Social and economic burden of human leishmaniasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 94(3): 489-493.
- [6] World Health Organization, “Leishmaniasis”, World Health Organization, 2023. [online]. Available: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. [Accessed: Jan. 8, 2024].
- [7] Ghorbani M, Farhoudi R (2018) Leishmaniasis in humans: drug or vaccine therapy?. *Drug Design, Development and Therapy* 12: 25-40.
- [8] Pan American Health Organization, “Guideline for the treatment of leishmaniasis in the Americas”, Pan American Health Organization, 2022. [Online]. Available: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/56120>. [Accessed: Jan. 6, 2024].
- [9] Sanchez MCA, Celeste BJ, Lindoso JAL, Fujimori M, Almeida RP, et al. (2020) Performance of rK39-based immunochromatographic rapid diagnostic test for serodiagnosis of visceral leishmaniasis using whole blood, serum and oral fluid. *PloS one* 15(4): 1-19.
- [10] BRASIL. Ministério da Saúde; Fundação Oswaldo Cruz, “Imunofluorescência indireta para diagnóstico da Leishmaniose humana”, Fundação Oswaldo Cruz, 2024. [Online]. Available: <https://www.bio.fiocruz.br/index.php/br/produtos/reativos/ensaios-sorologicos/imunofluorescencia-indireta/leishmaniose-humana#:~:text=%C3%89%20um%20teste%20de%20imunofluoresc%C3%Aancia,luz%20azul%20e%20ultra%20violeta>. . [Accessed: Apr. 14, 2024].
- [11] Piyasiri SB, Samaranayake TN, Silva H, Manamperi NH, Karunaweera ND (2022) ELISA-based evaluation of antibody response to Leishmania in a region endemic for cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunology* 44(9): 1-19.
- [12] Elmahallawy EK, Martinez AS, Rodriguez-Granger J, Hoyos-Mallecot Y, Agil A, et al. (2014) Diagnosis of leishmaniasis. *Journal of Infection in Developing Countries* 8(8): 961-972.
- [13] Freire ML, Assis TM, Oliveira E, Avelar DM, Siqueira IC, et al. (2019) Performance of serological tests available in Brazil for the diagnosis of human visceral leishmaniasis. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 13(7): 1-12.
- [14] Figueiredo MM, Santos ARR, Godoi LC, Castro NS, Andrade BC, et al (2021) Improved Performance of ELISA and Immunochromatographic Tests Using a New Chimeric A2-Based Protein for Human Visceral Leishmaniasis Diagnosis. *Journal of immunology research* 2021: 1-15.
- [15] Campos DAR, Júnior JGR., Castro RN, Oliveira IRWZ (2023) Biossensores Eletroquímicos Baseados em Peroxidase: Revisão. *Revista Virtual em Química*: 1-20.
- [16] Idris AO, Akanji SP, Orimolade BO, Olorundare FOG, Azizi S, et al (2023) Using Nanomaterials as Excellent Immobilisation Layer for Biosensor Design. *Biosensors* 13(2): 192-216.
- [17] Suvarnaphaet P, Pechprasarn S (2017) Graphene-based materials for biosensors: a review. *Sensors* 21(17): 2161-.
- [18] Justino CIL, Gomes AR, Freitas AC, Duarte AC, Rocha-Santos TAP. (2017) Graphene based sensors and biosensors. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 91: 53-66.
- [19] Bollella P, Fusco G, Tortolini C, Sanzò G, Favero G, et al. (2017) Beyond graphene: electrochemical sensors and biosensors for biomarkers detection. *Biosensors and Bioelectronics* 89(1): 152-166.
- [20] Martins BR, Barbosa YO, Andrade CMR, Pereira LQ, Simão GF, et al. (2020) Development of an Electrochemical Immunosensor for Specific Detection of Visceral Leishmaniasis Using Gold-Modified Screen-Printed Carbon Electrodes. *Biosensors* 10(8), 81.

[21] Naresh V, Lee N (2021) A Review on Biosensors and Recent Development of Nanostructured Materials-Enabled Biosensors. *Sensors* (4): 1109.

[22] Martins BR, Andrade CMR, Simão GF, Martins RP, Severino LB, et al. (2024) A comparative study of graphene-based electrodes for electrochemical detection of visceral leishmaniasis in symptomatic and asymptomatic patients. *Talanta Open* 10: 1-11.

[23] Costa MMS, Gazzinelli RT, Fernandes AP (2010) Peptídeos recombinantes, método e kit para teste imunodiagnóstico da leishmaniose visceral. 2010, Brasil.

Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: PI10134476, título: "Peptídeos recombinantes, método e kit para teste imunodiagnóstico da leishmaniose visceral", Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 20/08/2010; Depósito PCT: 20/08/2010.

[24] Segundo JEDV, Vilar EO (2016) Grafeno: Uma revisão sobre propriedades, mecanismos de produção e potenciais aplicações em sistemas energéticos. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos* 11 (2): 54-57.

[25] Balvedi RP, Castro AC, Madurro JM, Brito-Madurro AG (2014) Detection of a Specific Biomarker for Epstein-Barr Virus Using a Polymer-Based Genosensor. *International Journal of Molecular Sciences* 15(5): 9051-9066.

[26] Balvedi RPA (2015) Biossensores para detecção do vírus Epstein-Barr: diagnóstico de fisiopatologias. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

## APÊNDICE B – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO

24/09/2024, 23:12

E-mail de UFTM - Universidade Federal do Triângulo Mineiro - Please Respond to this Mail: NNOA



Luana Barbosa Severino <d202120284@uftm.edu.br>

---

### Please Respond to this Mail: NNOA

2 mensagens

---

Nanomedicine & Nanotechnology <nano@medwinpublishers.com>  
Para: d202120284@uftm.edu.br

19 de setembro de 2024 às 09:27

Dear Dr. Luana Barbosa Severino,

Greetings...!!

We would like to inform you that as we have approached you with our previous mail regarding **article ID & processing of your payment** i.e. \$649 hope it received well but we haven't receive any response from you, could you please respond to our mails and **process your payment through the below link** as soon as possible and enable us to proceed for further process.

**Link:** <https://medwinpublishers.com/pay-online.php>

Do acknowledge us with the payment receipt once you have done with the payment.

Kind regards,  
**Paula Annette**

Assistant Managing Editor

## APÊNDICE C – DADOS SUPLEMENTARES

O processo de ativação e redução realizado na superfície dos eletrodos de grafeno tiveram o intuito de aumentar a área superficial desse material e dessa forma favorecer o processo de adsorção do antígeno. O que se lê no artigo está como reduzir a superfície, mas o que se quer dizer é realizar o processo de ativação e redução.

Nos resultados obtidos em eletrodo de grafeno, pode-se verificar dissociação das moléculas em detecção do paciente controle negativo e paciente com doença de Chagas. Isso se deve à ausência de afinidade das biomoléculas com a superfície do eletrodo, fazendo com que o processo de ligação não ocorra. Quando o antígeno é adsorvido e posteriormente ocorre a deposição do anticorpo, o mesmo pode se ligar ou não. Nos processos de lavagens que ocorrem, se o anticorpo se ligar ao antígeno, eles não dissociam, porém se a ligação não acontece, essas moléculas podem ser lavadas. Desse modo, observa-se o aumento no pico de corrente, já que na dissociação, a resistência diminui e a superfície do eletrodo torna-se livre para a passagem da corrente.

A curva de calibração foi realizada com eletrodo de grafeno sem modificação das nanopartículas de ouro, já que os eletrodos em questão tiveram melhor desempenho na construção do imunossensor. As incubações seguem as mesmas condições dos demais testes. O antígeno DTL-4 foi utilizado na concentração de 10 ng/mL e o soro dos pacientes (amostra utilizada para o analito anticorpo) nas concentrações apresentadas na figura 5 do artigo.

**APÊNDICE D – LISTA DA PARTICIPAÇÃO DE COAUTORES**

Ana Paula Fernandes. Pesquisadora nível 1A do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e Professora Titular da Universidade Federal de Minas Gerais. E-mail: apfernandes.ufmg@gmail.com

Anderson Barbosa Lima. Pós-doutor em Ciências Exatas e da Terra pela Universidade Federal da Bahia. Professor 3º grau da Universidade Federal do Triângulo Mineiro. E-mail: anderson.lima@uftm.edu.br

Beatriz Rodrigues Martins. Doutora em Ciências Fisiológicas. Pós-doutoranda em química pela Universidade Federal de Uberlândia. E-mail: biaroma\_95@hotmail.com

Cristhianne Molinero Ratkevicius Andrade. Pós-doutora em Microbiologia pela Universidade Federal do Triângulo Mineiro. Bolsista de Desenvolvimento Tecnológico Industrial, nível A. E-mail: cristhianne\_m@hotmail.com

Guilherme Felipe Simão. Mestre em Tecnologia de Materiais pela Universidade Federal do Triângulo Mineiro. E-mail: guilhermefelipesimao@gmail.com

Renata Pereira Alves. Professora Adjunta do Magistério Superior na Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Campus Universitário Iturama. E-mail: renata.pereira@uftm.edu.br

Rhéltheer de Paula Martins. Doutor em Ciências Fisiológicas pela Universidade Federal do Triângulo Mineiro. E-mail: rheltheer.martins@uftm.edu.br

Virmondes Rodrigues Júnior. Professor titular da Universidade Federal do Triângulo Mineiro. E-mail: virmondes.rodrigues@uftm.edu.br