UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSSENSORES ELETROQUÍMICOS PARA DETECÇÃO DE BIOMARCADORES DA MALÁRIA

ARIAMNA MARÍA DIP GANDARILLA

Doutorado

MANAUS/AM

Fevereiro/2022

ARIAMNA MARÍA DIP GANDARILLA

DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSSENSORES ELETROQUÍMICOS PARA DETECÇÃO DE BIOMARCADORES DA MALÁRIA

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas como parte das exigências para a obtenção do título de doutor em Química, com ênfase na Linha de Pesquisa Química de Materiais e Interfaces.

Prof. Dr. WALTER RICARDO BRITO

Orientador

Dr. DANIEL MATIAS GASTON REGIART

Coorientador

MANAUS/AM

Fevereiro/2022

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

G195d

Gandarilla, Ariamna María Dip
Desenvolvimento de imunossensores eletroquímicos para detecção de biomarcadores da Malária. / Ariamna María Dip Gandarilla . 2022
95 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Walter Ricardo Brito
Coorientador: Daniel Matias Gaston Regiart
Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Imunossensores eletroquímicos. 2. Proteína rica em histidina 2. 3. Lactato desidrogenase. 4. Dihexadecil fosfato. 5. Polipirrol carboxilado. I. Brito, Walter Ricardo. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

Desenvolvimento de imunossensores eletroquímicos para detecção de biomarcadores da Malária

ARIAMNA MARÍA DIP GANDARILLA

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal do Amazonas como requisito parcial para a obtenção do Grau de Doutor(a) em Química.

Aprovada em, 25 de fevereiro de 2022.

WALTER RICARDO BRITO (PPGQ/UFAM)
Presidente/Orientador

LIANET AGUILERA DOMINGUEZ (PPGQ/UFAM)
Membro Interno

PAULO ROGÉRIO DA COSTA COUCEIRO
Membro Interno

YONNY ROMAGUERA BARCELAY (DF/UFAM)
Membro Externo

MARCOS MARQUES DA SILVA PAULA (DF/UFAM)
Membro Externo

Universidade Federal do Amazonas
Manaus, 25 de fevereiro de 2022.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, familiares e amigos pelo apoio durante todos estes anos, que contribuíram para a realização deste sonho que é obter o título de Doutora em Química.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Walter Ricardo Brito, pelo apoio incondicional a cada dia de trabalho, que mesmo com as dificuldades durante a pesquisa sempre teve disposição, paciência e positivismo no sucesso deste projeto. Agradeço também ao meu coorientador, Dr. Daniel Matias Regiart, por todas as contribuições realizadas durante a execução das fases deste estudo.

Aos meus colegas do Laboratório de Bioeletrônica e Eletroanalítica/UFAM e outros alunos da Central Analítica/UFAM, por todo o apoio e suporte oferecido desde o primeiro dia que cheguei ao Brasil; que mesmo sem saber falar o idioma, sempre fui acolhida e me ensinaram muito até os dias de hoje. Sempre serei grata a vocês.

Aos alunos e professores da FioCruz/Manaus, que desde o início trabalharam em conjunto conosco e disponibilizaram todo o material biológico, indispensável para a execução do projeto.

Aos professores do PPGQ/UFAM, por todos os conhecimentos ensinados em aulas, palestras e eventos.

Aos professores participantes da banca de defesa, que aceitaram avaliar nosso trabalho.

À UFAM, por toda infraestrutura laboratorial que permitiu o desenvolvimento de nosso trabalho e a outras instituições parceiras onde foram realizados vários experimentos (Instituto Leônidas e Maria Deane-ILMD/FioCruz-Manaus, Instituto de Química da Universidade de São Paulo-USP, Instituto de Pesquisa do Amazonas-INPA, Instituto Federal do Amazonas-IFAM e Instituto de Pesquisas Nucleares e Energéticas-IPEN/São Paulo).

À CAPES, pela bolsa de doutorado recebida, muito necessária para o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

A infecção por malária constitui uma das principais doenças que afetam a população de muitos países do mundo, entre eles o Brasil, onde representa um grave problema de saúde pública, especialmente na região Amazônica. Atualmente, a procura por métodos simples, eficientes e de baixo custo para o diagnóstico da doença vem sendo intensificada e o uso de materiais aplicados a sistemas de detecção bio-analítica baseados em elementos de reconhecimento (anticorpos e antígenos) representa uma alternativa promissora. Neste trabalho é proposto o desenvolvimento de imunossensores eletroquímicos para a detecção de biomarcadores da malária. Os dispositivos foram fabricados sobre eletrodos de ouro (disco (AuDE) ou impressos (AuSPE)) utilizando diferentes metodologias de funcionalização destes substratos: matriz polimérica de dihexadecil fosfato (DHP), filmes condutores (eletropolimerização de Poli(pirrol-pirrol carboxilado), P(Py-Py3COOH)) ou formação de camadas automontadas de compostos ligantes (cisteamina (Cis)/glutaraldeído (Glut)). As etapas de modificação dos eletrodos foram caracterizadas mediante técnicas microscópicas (microscopia eletrônica de varredura e microscopia de força atômica), espectroscópicas (espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier, espectroscopia Raman e espectroscopia de energia dispersiva de raios X) e eletroquímicas (voltametria cíclica, voltametria de pulso diferencial (DPV) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS)). Foram realizados ensaios de otimização das variáveis analíticas (concentração de anticorpos e tempos de incubação de anticorpos e antígenos), detecção analítica das proteínas recombinantes mediante DPV, EIS ou ensaio de imunoabsorção ligado a enzima (ELISA), testes de interferentes e testes com amostras de soro humano incrementadas com antígeno. Os resultados mostraram que o imunossensor AuDE/DHP/Anti-*Pf*HRP2(IgG) apresenta estabilidade, boa seletividade e alta sensibilidade, detectando concentrações do analito entre 10 e 400 ng mL^{-1}, com limite de detecção (LD) de 3,3 ng mL^{-1} por EIS, entre 10 e 500 ng mL^{-1}, com LD = 2,8 ng mL^{-1} por DPV e entre 15 e 125 ng mL^{-1}, com LD = 5,5 ng mL^{-1} por ELISA. O imunossensor AuSPE/P(Py-Py3COOH)/Anti-*Pf*HRP2(IgY)/BSA registrou uma boa sensibilidade por EIS e ELISA, na faixa de 100 a 1000 ng mL^{-1}, com LD de 27,47 e 53,95 ng mL^{-1}, respectivamente. O dispositivo mostrou ser seletivo para molécula alvo (*Pf*HRP2), sem notável interferência dos outros compostos testados. O imunossensor AuDE/Cis/Glut/Anti-*Pv*LDH(IgY)/BSA registrou uma resposta aceitável por DPV na faixa de 10 a 50 µg mL^{-1}, com LD = 455 ng mL^{-1} e mostrou ser seletivo para a molécula alvo (*Pv*LDH). Os três imunossensores exibiram um bom desempenho na detecção dos biomarcadores estudados e podem constituir uma ferramenta para o diagnóstico da malária causada por *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax,* as duas espécies predominantes no Brasil.

Palavras chaves: Imunossensores eletroquímicos, Malária, Proteína rica em histidina 2, Lactato desidrogenase, Dihexadecil fosfato, Polipirrol carboxilado.

ABSTRACT

Malaria is one of the most important infectious diseases that affect the population of many countries in the word, including Brazil, where it represents a serious public health problem, especially in the Amazon region. Currently, the development of simple, efficient, and low-cost methods for malaria diagnosis has intensified, and the application of biomaterials based on the use of antibodies and antigens in bioanalytical detection systems represents a promising alternative. In this work, we proposed the development of electrochemical immunosensors for detection of malaria biomarkers. The devices were fabricated on gold electrodes (disk (GE) or screen-printed (SPGE)) and using different methodologies of electrodes functionalization: polymeric matrix of dihexadecyl phosphate (DHP), conductive films (electropolymerization of Poly(pyrrole-pyrrole carboxylated), P(Py-Py3COOH)) or formation of self-assembled monolayers through the use of linkers (cysteamine (Cys)/glutaraldehyde (Glut)). The electrode modification steps were characterized by microscopic (scanning electron microscopy and atomic force microscopy), spectroscopic (Fourier-transform infrared spectroscopy, Raman spectroscopy and energy-dispersive X-ray spectroscopy) and electrochemical (cyclic voltammetry, differential pulse voltammetry (DPV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS)) techniques. The analytical variables were optimized (antibodies concentration and incubation times in antibodies and antigens) and were performed the analytical detection of the recombinant proteins by means of DPV, EIS or enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Also, tests of interfering molecules and tests with human serum samples spiked with antigen were carried out. The results showed that Ab-*Pf*HRP2(IgG)/DHP/GE immunosensor present stability, good selectivity, and high sensitivity, detecting concentrations between 10 and 400 ng mL^{-1} of the target analyte, with a detection limit (LD) of 3.3 ng mL^{-1} by EIS, between 10 and 500 ng mL^{-1}, with LD = 2.8 ng mL^{-1} by DPV, and between 15 and 125 ng mL^{-1}, with LD = 5.5 ng mL^{-1} by ELISA. The BSA/Ab-*Pf*HRP2(IgY)/P(Py-Py3COOH)/SPGE immunosensor registered a good sensitivity by EIS and ELISA in the concentration range of 100 to 1000 ng mL^{-1}, with LD of 27.47 and 53.95 ng mL^{-1}, respectively. The device proved to be selective for the target molecule (*Pf*HRP2), without notable interference from the other compounds tested. The BSA/Ab-*Pv*LDH(IgY)/Glut/Cys/GE immunosensor recorded an acceptable response by DPV from 10 to 50 µg mL^{-1}, with LD = 455 ng mL^{-1}, and proved to be selective for the target molecule (*Pv*LDH). The three immunosensors exhibited a good performance for detection of the biomarkers studied and may constitute a tool for the diagnosis of malaria caused by *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*, the two predominant species in Brazil.

Keywords: Electrochemical immunosensors, Malaria, Histidine-rich protein 2, Dehydrogenase lactate, Dihexadecyl phosphate, Polypyrrole carboxylated.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Ac	Anticorpos
AFM	Microscopia de Força Atômica
Ag	Antígenos
Anti-*Pf*HRP2 (IgG)	Anticorpos da proteína rica em histidina de *plasmodium falciparum,* tipo Imunoglobulinas G (IgG) (produzida em camundongos)
Anti-*Pf*HRP2(IgY)	Anticorpos da proteína rica em histidina 2 de *plasmodium falciparum*, tipo Imunoglobulinas Y (IgY) (produzidos em galinhas)
Anti-*Pv*LDH(IgY)	Anticorpos de lactato desidrogenase de *plasmodium vivax*, tipo Imunoglobulinas Y (IgY) (produzidos em galinhas)
AM	Azul de Metileno
ATP	Trifosfato de adenosina
AuDE	Eletrodo de disco de ouro
AuSPE	Eletrodo impresso de ouro
BSA	Albumina de soro bovino
Cis	Cisteamina
CPs	Polímeros condutores
CV	Voltametria cíclica
DHP	Dihexadecil fosfato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPV	Voltametria de pulso diferencial
EDC	Cloridrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N′-etilcarbodiimida
EDS	Espectroscopia de energia dispersiva de raios X (*Energy-dispersive X-ray spectroscopy*)
EIS	Espectroscopia de impedância eletroquímica (*electrochemical impedance spectroscopy*)
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Ligado a Enzima
E.U.A	Estados Unidos de América
FTIR	Espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier
GDH	Glutamato Desidrogenase
Glut	Glutaraldeído
HGPRT	Hipoxantina-Guanina Fosforribosiltransferase
HRPs	Proteínas ricas em histidina
Ig	Imunoglobulinas
ITO	Óxido de índio dopado com estanho (*Índium Tin Oxide)*
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada (*International Union of Pure and Applied Chemistry*)
LAMP	Amplificação isotérmica mediada por laço

LED	Diodos emissores de luz (*light-emitting diode*)
LD	Limite de detecção
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
NAATs	Testes de amplificação de ácidos nucleicos
NADP	Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida
NADPH	Forma reduzida do $NADP^+$
NHS	N-hidroxisuccinimida
NTC	Nanotubos de carbono
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PBS	Solução tampão fosfato-salino
p	*Plasmodium*
Pf	*Plasmodium falciparum*
*Pf*HRP2	Proteína rica em histidina 2 de *plasmodium falciparum*
Pv	*Plasmodium vivax*
*Pv*LDH	Lactato desidrogenase de *plasmodium vivax*
PPy	Polipirrol
PPy3COOH	Polipirrol carboxilado
P(Py-Py3COOH)	Copolímero (Poli (pirrol- pirrol ácido-3-carboxílico))
RDTs	Testes de diagnósticos rápidos
SAMs	Monocamadas automontadas
RNA	Ácido ribonucleico
SECM	Microscopia eletroquímica de varredura
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Mapa das áreas de transmissão da malária em 2019 [Adaptado de WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020]. 5

Figura 1.2. Ciclo de vida dos parasitas *Plasmodium* causadores da malária humana [Adaptado de MUELLER *et al*., 2009]. 6

Figura 1.3. Mecanismo de ação dos testes de diagnóstico rápido [Adaptado de WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015b]. 11

Figura 1.4. Representação esquemática da organização dos componentes funcionais de um biossensor eletroquímico. 13

Figura 1.5. Componentes básicos de um imunossensor eletroquímico, baseados em duas estratégias de detecção. A: Detecção direta sem marcadores, e B: Detecção baseada em marcadores enzimáticos [Adaptado de CHO *et al*., 2018]. 15

Figura 1.6. Representação da estrutura de um anticorpo (IgG), exibindo as diferentes regiões [Adaptado de GOPINATH *et al*., 2014]. 16

Figura 1.7. Mecanismo de eletropolimerização do pirrol [Adaptado de SADKI *et al*., 2000]. 21

Figura 1.8. Formação de SAMs sobre a superfície de ouro A: usando um composto tiol, e B: usando uma mistura de dois tioles [Adaptado de SINGH *et al.*, 2020]. 22

Figura 1.9. A: Sinal de excitação em CV, B: Voltamograma cíclico para um sistema reversível [Adaptado de SKOOG *et al*., 2006]. 24

Figura 1.10. Voltametria de pulso diferencial. A: Esquema de aplicação de potenciais (algumas vezes sobrepostos numa rampa, em vez de uma escada). B: Perfil esquemático de ΔI *vs* E [Adaptado de BRETT & BRETT, 1993]. 26

Figura 1.11. Representação das medidas de EIS. A: Gráfico de Nyquist, B e C: Gráfico de Bode (impedância e fase, respectivamente), e D: Circuito equivalente de Randles (com controle de transferência de carga e controle cinético) [Adaptado de GAMRY INSTRUMENTS, 2010]. 27

Figura 2.1 Diagrama do processo de fabricação dos imunossensores sobre substratos de ouro usando DHP como polímero de imobilização. 34

Figura 3.1. Imagens de MEV dos eletrodos de ouro em diferentes ampliações. A e B: AuDE e C e D: AuSPE. 39

Figura 3.2. Comportamento eletroquímicos dos eletrodos de ouro. A: AuDE e B: AuSPE em diferentes soluções eletrolíticas. 40

Figura 3.3. Representação esquemática das etapas de fabricação do imunossensor baseado em eletrodo modificado com DHP e procedimento analítico para determinação de Ag-*Pf*HRP2. 42

Figura 3.4. Espectros FTIR-ATR da superfície do eletrodo de ouro (AuDE), AuDE modificado com DHP e AuDE modificado com DHP/Anti-*Pf*HRP2(IgG). 43

Figura 3.5. Imagens de MEV do eletrodo de ouro limpo e modificado. A: AuDE limpo, B: AuDE/DHP e C: AuDE/DHP/Anti-*Pf*HRP2(IgG). 43

Figura 3.6. Imagens de AMF (i): bidimensional e ii): tridimensional) da superfície dos eletrodos modificados. A: AuDE/DHP e B: AuDE/DHP/Anti-*Pf*HRP2(IgG). 44

Figura 3.7. A: Voltamogramas cíclicos, B: Diagramas de Nyquist e C e D: Diagramas de Bode das diferentes etapas de modificação dos AuDE em solução de $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ (5 mmol L^{-1}) + KCl (0,1 mol L^{-1}). 45

Figura 3.8. A: Voltamogramas cíclicos do imunossensor AuDE/DHP/Anti-*Pf*HRP2(IgG), obtidos a diferentes velocidades de varredura (10, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200 mV s^{-1}) em solução de $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ (5 mmol L^{-1}) + KCl (0,1 mol L^{-1}). B: Corrente de pico *vs* raiz quadrada da velocidade de varredura, e C: Voltamogramas do imunossensor antes e após uma semana de armazenamento a 4 °C. 48

Figura 3.9. Otimização de A: Concentração de Anti-*Pf*HRP2(IgG) usada na imobilização e B: Tempo de incubação em solução de Ag-*Pf*HRP2. 50

Figura 3.10. Resposta do imunossensor após incubação em diferentes concentrações de Ag-*Pf*HRP2 em solução de $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ (5 mmol L^{-1}) + KCl (0,1 mol L^{-1}). A: Diagramas de Nyquist, B: Curva de calibração (resistência *vs* concentração de Ag-*Pf*HRP2). 51

Figura 3.11. Resposta do imunossensor após incubação em diferentes concentrações de Ag-*Pf*HRP2 em solução de $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ (5 mmol L^{-1}) + KCl (0,1 mol L^{-1}). A: Voltamogramas de DPV, B: Curva de calibração (corrente *vs* concentração de Ag-*Pf*HRP2). 52

Figura 3.12. A: Curva de calibração do ELISA e B: Correlação entre o ELISA e a detecção do imunossensor por EIS. 53

Figura 3.13. Representação esquemática das etapas de fabricação do imunossensor baseado em eletrodo modificado com DHP e NTC e procedimento analítico para determinação de Ag-*Pf*HRP2. 54

Figura 3.14. Caracterização eletroquímica dos AuSPE modificados com DHP, NTC e Anti-*Pf*HRP2(IgG) em solução de $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ (5 mmol L^{-1}) + KCl (0,1 mol L^{-1}). A: Voltametria de pulso diferencial e B: Espectroscopia de impedância eletroquímica (diagrama de Nyquist), ... 55

Figura 3.15. A: Imagem óptica do eletrodo de ouro modificado com diferentes materiais: (1) DHP/Anti-*Pf*HRP2(IgG)-NTC, (2) DHP/Anti-*Pf*HRP2(IgG), (3) DHP/NTC e (4) DHP. Imagens SECM obtidas em solução de $[Fe(CN)_6]^{3-}$ 10 mM + KCl 0,1M, B: antes e C: após exposição à solução de Ag-*Pf*HRP2. D: Mapa de correntes normalizada para os 4 diferentes eletrodos modificados [Adaptada de DIP GANDARILLA *et al*., 2021b]. 56

Figura 3.16. Representação esquemática do processo de fabricação do imunossensor AuSPE/P(Py-Py3COOH)/Anti-*Pf*HRP2(IgY)/BSA e detecção do Ag-*Pf*HRP2. 58

Figura 3.17. A:Voltamograma cíclico do processo de eletropolimerização do copolímero P(Py-Py3COOH) em solução de PBS 0,1 molL^{-1} pH7. B: Espectro Raman de AuSPE limpo e modificado com P(Py-Py3COOH). 58

Figura 3.18. Imagens de MEV de A: AuSPE limpo e B: AuSPE/P(Py-Py3COOH). 59

Figura 3.19. Espectros EDS de A: AuSPE e B: P(Py-Py3COOH). 60

Figura 3.20. A: Gráfico de Bode do eletrodo de AuSPE antes e após modificação com o filme polimérico (inserido diagrama de Nyquist do AuSPE limpo), B: Gráfico de Nyquist e C: Gráfico de Bode das etapas de fabricação do imunossensor em solução de $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ (5 mmol L^{-1}) + KCl (0,1 mol L^{-1}). 61

Figura 3.21. Otimização do tempo de incubação em solução de Anti-*Pf*HRP2(IgY)..... 63

Figura 3.22. EIS do imunossensor após incubação em diferentes concentrações de *Pf*HRP2. A: Diagrama de Nyquist e B: Diagrama de Bode em solução de $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ (5 mmol L^{-1}) + KCl (0,1 mol L^{-1}). 64

Figura 3.23. A: Curva de calibração obtida por EIS em solução de $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ (5 mmol L^{-1}) + KCl (0,1 mol L^{-1}) (ΔR *vs* concentração de *Pf*HRP2) e B: Curva de calibração obtida no ensaio ELISA (D.O *vs* concentração de *Pf*HRP2). 64

Figura 3.24. Estudo de possíveis moléculas interferentes na detecção de *Pf*HRP2. EIS em solução de $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ (5 mmol L^{-1}) + KCl (0,1 mol L^{-1}) 65

Figura 3.25. Representação esquemática do processo de obtenção do imunossensor AuDE/Cis/Glut/Anti-*Pv*LDH(IgY)/BSA e detecção de Ag-*Pv*LDH. 66

Figura 3.26. Imagens de ângulo de contato para A: AuDE limpo e B: AuDE/Cisteamina. 67

Figura 3.27. DPV das diferentes etapas de modificação dos AuDE em solução de $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ (5 mmol L^{-1}) + KCl (0,1 mol L^{-1}). 68

Figura 3.28. Otimização do tempo de imersão em solução de cisteamina para a formação das SAMs. A: DPV em solução de $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ (5 mmol L^{-1}) + KCl (0,1 mol L^{-1}). B: ΔIpa *vs* tempo de incubação. 69

Figura 3.29. A: Resposta do imunossensor após incubação em diferentes concentrações de Ag-*Pv*LDH. A: DPV em solução de $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ (5 mmol L^{-1}) + KCl (0,1 mol L^{-1}). B: Curva de calibração (ΔIpa *vs* concentração de *Pv*LDH). 70

Figura 3.30. Estudo de possíveis moléculas interferentes na detecção de *Pf*HRP2. DPV em solução de $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ (5 mmol L^{-1}) + KCl (0,1 mol L^{-1}). 70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Principais sistemas eletroquímicos em CV (WANG, 2006)..... 25

Tabela 3.1. Parâmetros eletroquímicos obtidos na CV para os eletrodos AuDE e AuSPE usando diferentes soluções eletrolíticas..... 41

Tabela 3.2. Parâmetros eletroquímicos obtidos na CV para as diferentes etapas de modificação dos eletrodos AuDE. 46

Tabela 3.3. Comparação das diferentes concentrações de Ag-*Pf*HRP2 detectadas em amostras de soro humano por EIS e DPV usando o imunossensor e o teste ELISA (média de três determinações + Desvio padrão). 53

Tabela 3.4. Parâmetros eletroquímicos obtidos para os eletrodos (AuSPE) funcionalizados com DHP, NTC e Anti-*Pf*HRP2(IgG). 55

Tabela 3.5. Valores de corrente de pico anódico obtidas na DPV para as diferentes etapas de modificação dos AuDE. 68

Tabela 3.6. Comparação dos diferentes métodos previamente reportados para a detecção de Ag-*Pf*HRP2..... 71

Tabela 3.7. Comparação dos diferentes métodos previamente reportados para a detecção de Ag-*p*LDH. 72

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO 1
OBJETIVOS 3
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 4
1.1. MALÁRIA 4
1.1.1. Epidemiologia da Malária 4
1.1.2. Ciclo Biológico dos Parasitas 5
1.1.3. Principais Biomarcadores da Malária 7
1.2. TESTES PARA DETECÇÃO DA MALÁRIA 10
1.3. BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS 13
1.3.1. Generalidades 13
1.3.2. Imunossensores Eletroquímicos 14
1.3.3. Anticorpos 16
1.3.4. Métodos de Imobilização de Biomoléculas 17
1.3.5. Materiais Usados na Imobilização das Biomoléculas 19
1.4. TÉCNICAS ELETROQUÍMICAS 23
1.5. BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS PARA A DETECÇÃO DA MALÁRIA 27
2. MATERIAIS E MÉTODOS 30
2.1. MATERIAL BIOLÓGICO 30
2.2. REAGENTES E SOLUÇÕES 31
2.3. ELETRODOS UTILIZADOS E PROCEDIMENTOS DE LIMPEZA 31
2.4. EQUIPAMENTOS UTILIZADOS 32
2.5. FABRICAÇÃO DOS IMUNOSSENSORES BASEADOS EM DHP 33
2.6. FABRICAÇÃO DO IMUNOSSENSOR USANDO POLÍMEROS CONDUTORES 36
2.7. FABRICAÇÃO DO IMUNOSSENSOR USANDO MONOCAMADAS AUTOMONTADAS 38
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 39
3.1. CARACTERIZAÇÃO DOS ELETRODOS DE OURO 39
3.2. IMUNOSSENSORES BASEADOS EM DHP 41
3.2.1. Imunossensor AuDE/DHP/Anti-*Pf*HRP2(IgG) 41
3.2.1.1. Caracterização Química 42
3.2.1.2. Caracterização Morfológica 43
3.2.1.3. Caracterização Eletroquímica 45
3.2.1.4. Otimização das Variáveis Analíticas 49
3.2.1.5. Determinação Analítica de Ag-*Pf*HRP2 e Testes em Amostras Reais 50
3.2.2. Imunossensor AuSPE/DHP/Anti-*Pf*HRP2(IgG)-NTC 54
3.3. IMUNOSSENSOR BASEADO EM POLÍMEROS CONDUTORES (AUSPE/P(PY-PY3COOH)/ANTI-*PF*HRP2(IGY)/BSA) 57
3.3.1. Caracterização Morfológica e Análise Elementar 59
3.3.2. Caracterização Eletroquímica 60
3.3.3. Detecção do Biomarcador Ag-*Pf*HRP2 e Estudo de Moléculas Interferentes 63

3.4. IMUNOSSENSOR BASEADO EM MONOCAMADAS AUTOMONTADAS (AUDE/CIS/GLUT/ANTI-*PV*LDH(IGY)/BSA) 65
3.4.1. Caraterização Eletroquímica 67
3.4.2. Detecção do Biomarcador *Pv*LDH e Estudo de Moléculas Interferentes ... 69
3.5. COMPARAÇÃO COM BIOSSENSORES REPORTADOS NA LITERATURA 71
CONCLUSÃO 74
PERSPECTIVAS FUTURAS 76
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 77
ANEXOS 92

INTRODUÇÃO

A infecção por malária é causada por parasitas protozoários do gênero *Plasmodium* e transmitidas ao homem por mosquitos fêmeas da espécie *Anopheles*. Os primeiros indícios da doença apareceram na antiga China, Mesopotâmia, Egito e Índia, mas o verdadeiro entendimento da doença começou quando Alphonse Laveran descobriu em 1980, o parasita no sangue de pacientes infetados. Posteriormente, o mosquito foi considerado o vetor transmissor por Ronald Ross para a malária aviária em 1897 e por vários cientistas italianos para malária humana em 1900 (COX, 2010; MANGUIN *et al.*, 2010).

Apesar do conhecimento alcançado e os grandes esforços para o controle desta doença, atualmente, a malária constitui um sério e complexo problema de saúde pública. Em 2019, aproximadamente 229 milhões de casos de malária foram registrados a nível mundial, com maior incidência no continente africano (94%). A estimativa total foi de 409 mil mortes, sendo as crianças com menos de 5 anos o grupo mais vulnerável (representando 67%) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020). No Brasil, a malária representa um importante problema de saúde pública e a região Amazônica concentra aproximadamente 99% dos casos. A endemicidade da doença é dinâmica, ocorrendo variações de um ano para outro quanto a incidência e a área. A transmissão ocorre geralmente em áreas rurais, como comunidades ribeirinhas, assentamentos, áreas indígenas e garimpos, mas também são registrados casos em áreas urbanas e periurbanas (MINISTERIO DA SAÚDE, 2020)

Há cinco espécies associadas à malária humana *(Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovalae e Plasmodium knowlesi*), sendo as três primeiras fundamentalmente detectadas no Brasil. O quadro clínico típico da doença é caracterizado por febre, calafrios, sudorese profusa, fraqueza e cefaleia, que dependendo da espécie de *Plasmodium* infectante ocorrem em padrões cíclicos (MINISTERIO DA SAÚDE, 2017).

Atualmente, a detecção da doença é realizada por duas técnicas laboratoriais principais: microscopia tradicional ou uso de testes de diagnóstico rápidos (RDTs) (MOODY, 2002). A primeira consiste na observação da amostra de sangue em uma lâmina microscópica auxiliada por coloração. Esta abordagem requer profissionais treinados, instalações especializadas, tempos de análise relativamente longos e equipamentos e reagentes caros (KATTENBERG *et al.*, 2011). Por outro lado, os RDTs baseados na detecção de biomarcadores de *Plasmodium* são uma boa alternativa, apresentam vantagens

tais como: baixo custo, tempos de análises curtos, possibilidade de detecção *in situ* de várias espécies e não exigem trabalho qualificado, mas o desempenho e sensibilidade estão determinados pelas condições de temperatura, umidade, armazenamento e execução (CHIODINI *et al.*, 2007).

Outras técnicas avançadas como os testes de amplificação de ácidos nucleicos (NAATs) também são usadas, as quais consistem em detectar o ácido nucleico do parasita da malária. Refere-se à amplificação isotérmica mediada por alça (LAMP), reação em cadeia da polimerase (PCR) (quantitativa e em tempo real) e métodos quantitativos de amplificação baseada em sequência de ácidos nucleicos. As vantagens dos NAATs incluem alta sensibilidade, capacidade de detectar um parasita por μL de amostra de sangue, detecção de infecção multiparasitária, capacidade de processar muitas amostras simultaneamente e capacidade de detectar cepas resistentes a medicamentos. Porém, estas técnicas consomem tempo, são caras, têm baixa reprodutibilidade em baixas concentrações, requerem boas instalações laboratoriais e pessoas qualificadas (RAGAVAN *et al.*, 2018).

Nos últimos anos, os avanços na nanotecnologia permitiram a integração de novos materiais em sistemas de detecção bioanalítica baseados em elementos de reconhecimento como enzimas, anticorpos, ácidos nucléicos etc. Os biossensores são dispositivos caracterizados pela entrega de resultados simples, rápidos e precisos, devido à interação seletiva e sensível entre os bioreagentes e os analitos alvo, sem a necessidade de remover interferentes da amostra antes da detecção (FELIXA & ANGNES, 2018; GUERRERO *et al.*, 2019).

Os métodos eletroquímicos são amplamente utilizados para registrar respostas, e oferecem algumas vantagens (uso de baixas concentrações de amostra e volumes pequenos) quando comparado com outros métodos já existentes. A aplicação desses dispositivos tem sido estendida a diferentes áreas para o monitoramento de processos, diagnóstico clínico e avaliação da segurança ambiental, alimentar e da água (HASSANI *et al.*, 2018; SONG *et al.*, 2006).

No presente trabalho, o desenvolvimento de imunossensores eletroquímicos baseados em diferentes metodologias de funcionalização de eletrodos é proposto como alternativa tecnológica para a detecção de biomarcadores da malária.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

- Desenvolver imunossensores eletroquímicos baseados em diferentes metodologias de funcionalização de substratos condutores para o reconhecimento biológico de biomarcadores da malária.

Objetivos Específicos

- Fabricar um imunossensor através da imobilização de anticorpos Anti-*Pf*HRP2 (tipo IgG) sobre a superfície de eletrodos de disco de ouro usando dihexadecil fosfato como matriz polimérica, visando a obtenção de resposta eletroquímica;
- Fabricar um imunossensor através da imobilização de anticorpos Anti-*Pf*HRP2 (tipo IgY) sobre a superfície de eletrodos impressos de ouro modificados com polímeros condutores (polipirrol carboxilado), visando a obtenção de resposta eletroquímica;
- Fabricar um imunossensor através da imobilização de anticorpos Anti-*Pv*LDH (tipo IgY) sobre a superfície de eletrodos de disco de ouro modificados com monocamadas automontadas de compostos ligantes (cisteamina), visando a obtenção de resposta eletroquímica;
- Caracterizar as diferentes etapas de fabricação dos imunossensores mediante técnicas microscópicas (MEV e AFM), eletroquímicas (CV, DPV e EIS) e espectroscópicas (FTIR, RAMAN e EDS);
- Estudar os processos de reconhecimento molecular anticorpo-antígeno mediante a detecção eletroquímica (DPV ou EIS) do analito alvo em soluções de diferentes concentrações (curvas analíticas e cálculo dos limites de detecção);
- Otimizar as variáveis analíticas: concentração de anticorpos e tempo de incubação em solução de anticorpos, antígenos e cisteamina, visando a obtenção do melhor desempenho dos imunossensores;
- Estudar possíveis moléculas interferentes e realizar testes em amostras de soro sanguíneo humano;
- Validar os métodos analíticos propostos mediante a comparação com resultados obtidos pelo método ELISA.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Malária

A malária é uma doença grave, também chamada de impaludismo, causada por um pequeno protozoário pertencente a espécie *Plasmodium* e transmitida ao homem pela picada do mosquito fêmea da espécie *Anopheles.* A doença é caracterizada como infecciosa, não contagiosa e de transmissão vetorial (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2019). Acredita-se que a história dos surtos de malária remonta-se ao início da civilização, aproximadamente 2700 anos antes de cristo, sendo muito difundida pela alta quantidade de mortes que aconteciam na época e foi considerada a causa de grandes derrotas militares (COX, 2010; TALAPKO *et al.*, 2019).

No final do século XIX, o real motivo da infecção pela malária ainda era desconhecido. Já em 1880, a interpretação da doença foi mudada, quando o cirurgião do exército francês Charles Louis Alphonse Laveran observou pela primeira vez parasitas no sangue de pacientes infectados, descoberta pela qual posteriormente receberia o Prêmio Nobel em 1907. Os estudos científicos só se tornaram possíveis após esta descoberta e quando Ronald Ross e vários cientistas italianos reportaram ao mosquito como agente transmissor da doença (TAN & AHANA, 2009).

1.1.1. Epidemiologia da Malária

Globalmente, a malária está distribuída em seis regiões definidas pela Organização Mundial da Saúde (OMS), afetando fundamentalmente muitos países tropicais e subtropicais (Figura 1.1). Em 2019, estima-se que 229 milhões de casos foram reportados em 87 países onde a malária é endêmica. Desses, dezenove países da África Subsaariana e a Índia somaram quase 85% dos casos totais. Já na região das Américas, a OMS registrou um aumento da doença, fundamentalmente em países como a Venezuela. O número de óbitos pela doença foi significativamente alto, registrando-se 409 mil mortes em 2019 (aproximadamente 94% na África) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020).

A exposição à infecção em mulheres grávidas e crianças prevalece em muitas regiões e tem consequências fatais, afetando a saúde da mãe e do feto, ocasionando partos prematuros e dando lugar a elevada mortalidade infantil. Calcula-se que em 2019, 12 milhões de mulheres grávidas na África estavam infectadas com o parasita e, consequentemente, 822

mil crianças nasceram com peso inferior ao adequado (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020).

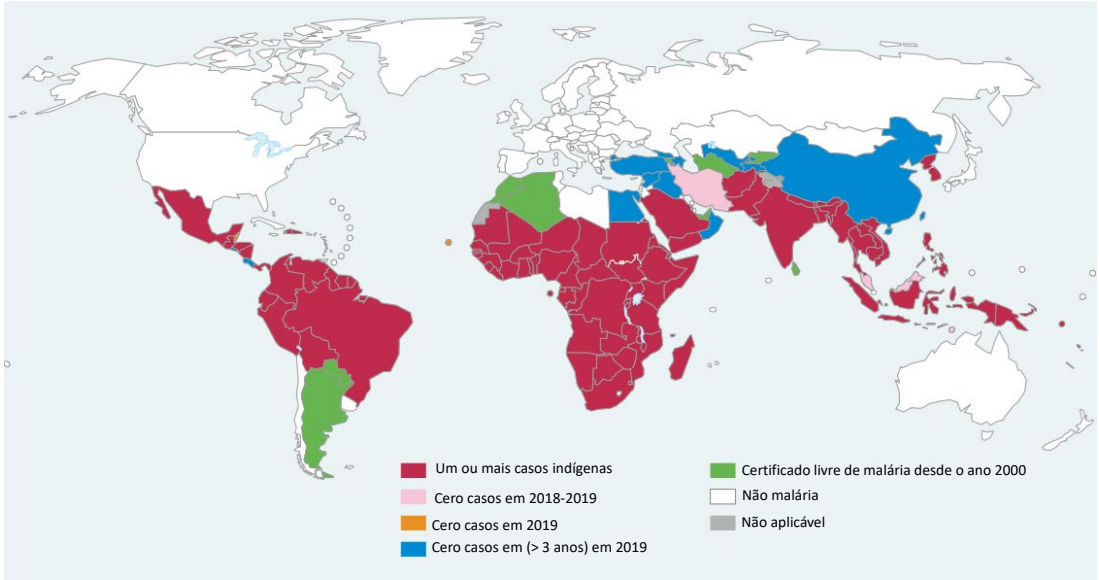

Figura 1.1. Mapa das áreas de transmissão da malária em 2019 [Adaptado de WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020].

O Brasil é considerado um dos principais países da América Latina afetado pela doença desde a década de 1930 (DEANE, 1992). Atualmente, a região amazônica concentra 99% dos casos totais. Entre 2007 e 2016, os casos apresentaram redução. No entanto, depois de quase 10 anos, apresentou expressivo acréscimo em 2017 (53% em relação a 2016). Em 2018, o país registrou 194.513 casos notificados, representado uma redução de 1% em relação ao ano anterior (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2019).

Historicamente, a malária tem experimentado grandes mudanças influenciadas por fatores complexos como fatores socioeconômicos (migrações, densidade populacional, atividades humanas desorganizadas, desmatamento e cuidado inadequado do ambiente), ambientais (hidrologia, clima, topografia e vegetação), biológicos (ciclo de vida dos vetores, agentes patológicos e imunidade da população) e médico-sanitário (atividades e efetividade do sistema de saúde) (DA SILVA *et al.*, 2010; OLIVEIRA-FERREIRA *et al.*, 2010).

1.1.2. Ciclo Biológico dos Parasitas

O *Plasmodium* é um parasita unicelular protozoário, que dependendo da espécie e seu estágio de desenvolvimento pode ser esférico, em forma de anel, alongado ou crescente, e pode variar em tamanho de 1 a 20 µm de diâmetro. As espécies *Plasmodium falciparum e Plasmodium vivax* constituem o principal foco da doença, onde graves

infecções provocam lesões de órgãos sistêmicos e defeitos nos mecanismos imunorreguladores da resposta do paciente, levando ao desenvolvimento de recorrência da doença e um estado portador parasitário assintomático (BLAIR TRUJILLO *et al.*, 2003; KHODZHAEVA *et al.*, 2019).

Os ciclos de vida das diferentes espécies de *Plasmodium* em humanos são muito semelhantes e a multiplicação do parasita acontece por três rotas diferentes, no hospedeiro e no vetor (ASHLEY *et al.*, 2018). A infecção é iniciada quando esporozoítos contidos nas glândulas salivares de mosquitos fêmeas do gênero *Anopheles* são injetados nos capilares, tecidos perivasculares ou feridas de pessoas saudáveis. Os esporozoítos entram rapidamente na corrente sanguínea ou no sistema linfático e passam através do sistema de circulação até o fígado, onde cada esporozoíto invade um hepatócito e acontece a fase de multiplicação assexuada, conhecida como esquizogônica pré-eritrocítica, levando à produção de milhares de merozoítos infecciosos (Figura 1.2) (COWMAN *et al.*, 2016).

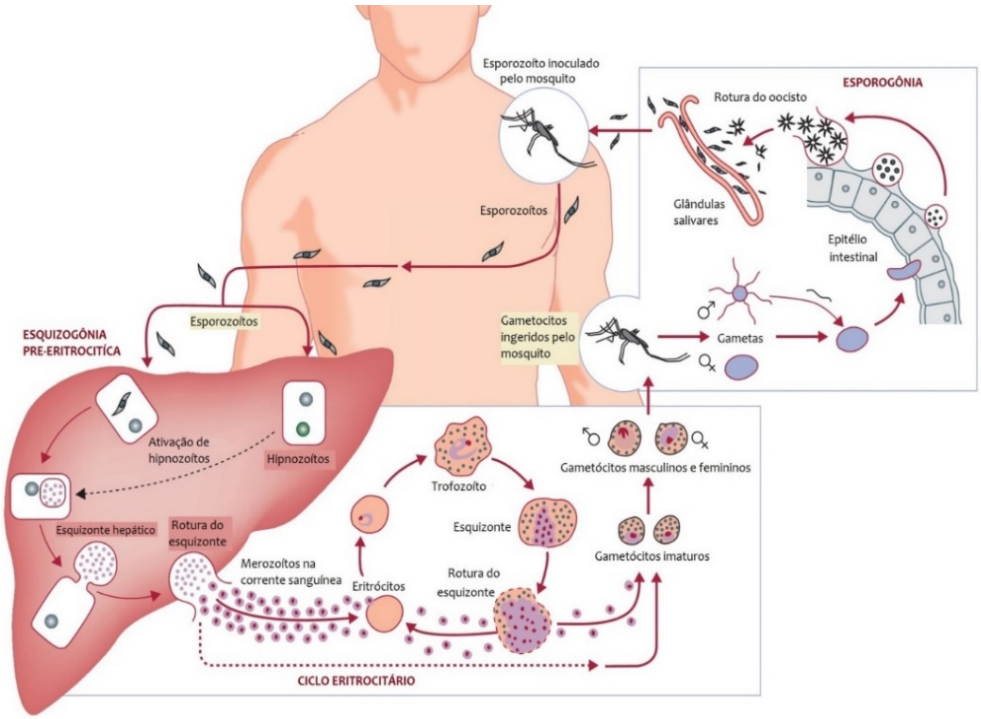

Figura 1.2. Ciclo de vida dos parasitas *Plasmodium* causadores da malária humana [Adaptado de MUELLER *et al.*, 2009].

Após o período de maturação (aproximadamente 8 - 10 dias), os esquizontes se rompem e libertam os merozoítos das células hepáticas à corrente sanguínea, invadindo os glóbulos vermelhos, onde inicia uma segunda fase de multiplicação assexual (esquizogonia

eritrocítica), resultando na produção de cerca de 8 a 16 merozoítos que invadem novos glóbulos vermelhos (ANTINORI *et al.*, 2012). Este processo é repetido quase indefinidamente e acompanhado pelo processo febril periódico e característico da doença. À medida que a infecção progride, alguns dos merozoítos nas hemácias sofrem gametogênese, formando gametócitos, que se multiplicam ainda mais através da união de gametas e entram na circulação periférica (permanecem em circulação aproximadamente 60 dias) até ser capturados por um mosquito (WHITE, 2017).

Posteriormente, os gametócitos amadurecem em gametas masculinos e femininos e mediante a fertilização, um zigoto móvel (ookinete) é formado durante as próximas 10 a 25 h dentro do lúmen do intestino do mosquito. O ookinete penetra na parede intestinal e se torna um oocisto notável, dentro do qual ocorre outra fase de multiplicação, resultando na formação de esporozoítos. Cada oocisto produz muitos milhares de esporozoítos invasivos durante um período de 7 a 12 dias, que migram para as glândulas salivares do mosquito, onde permanecem por períodos muito longos até serem injetados em outro hospedeiro vertebrado (pessoa saudável) quando a próxima refeição de sangue é feita (SIMONETTI, 1996; WHITE *et al.*, 2014).

1.1.3. Principais Biomarcadores da Malária

Hulka (1990) definiu os biomarcadores como alterações celulares, bioquímicas ou moleculares que são mensuráveis em meios biológicos, como tecidos, células ou fluidos humanos. Recentemente, foram incluídas na definição: medida e avaliação de características biológicas como um indicador de processos biológicos normais, processos patogênicos ou respostas farmacológicas a uma intervenção terapêutica (NAYLOR, 2003). No caso da malária, o uso de biomarcadores para detecção precoce de infecções do *Plasmodium* é uma ferramenta muito importante para o diagnóstico, que pode fornecer aproximações dinâmicas e poderosas no entendimento da doença (JAIN *et al.*, 2014). A seguir, descrevem-se brevemente os biomarcadores associados à doença:

- **Proteínas Ricas em Histidina (HRPs)**

As proteínas ricas em histidina são proteínas aproximadamente de 30 kDa, solúveis em água, ricas em aminoácidos histidina (73%), além de alanina (7%), prolina (7,5%), ácido glutâmico (6%) e ácido aspártico (2,1%) (SCHNEIDER & MARLETTA, 2005). *Plasmodium falciparum* sintetiza um conjunto único de HRPs solúveis durante o

desenvolvimento eritrocítico assexual: HRP 1, HRP 2 e HRP 3. A primeira ajuda na cito-aderência de eritrócitos infectados no endotélio venoso e contribui parcialmente para a alta parasitemia e hipóxia associada ao parasita. HRP 2 é um biomarcador exclusivo do *P. falciparum* e está relacionado à ligação com glicosaminoglicanos causando a inibição de antitrombina e desintoxicação da heme formando hemozoína. Já o HRP 3, também conhecido como proteína pequena rica em histidina-alanina é encontrada em menor proporção, quanto as outras (JAIN *et al.*, 2014).

*Pf*HRP2 é muito estável, encontrada principalmente no citoplasma do parasita e liberada em abundância na corrente sanguínea do hospedeiro. Pode ser detectada nos glóbulos vermelhos, soro, plasma, fluido cerebrospinal e urina dos indivíduos infectados, existindo uma correlação positiva entre a concentração sanguínea da proteína e a biomassa do parasita (MOUATCHO & DEAN GOLDRING, 2013).

- **Lactato Desidrogenase (LDH)**

O LDH é uma enzima solúvel em água, produzida pelos estágios sexuais e assexuais dos parasitas, incluindo os gametócitos maduros de todas as espécies humanas de *Plasmodium.* Expressada em altas concentrações, ela é essencial para a geração anaeróbica de trifosfato de adenosina (ATP) e catalisa a via glicolítica do parasita, ajudando a converter o piruvato em lactato, enquanto as mitocôndrias minimamente contribuem ao acúmulo de ATP. O *p*LDH, possui 26% de sequência de aminoácidos idêntico com LDH humano, conserva resíduos catalíticos para atividade enzimática e compartilha aproximadamente 90% de identidade de aminoácidos entre todas as espécies *Plasmodium* (BARBER *et al.*, 2013).

- **Aldolase**

A aldolase é uma enzima que desempenha um papel essencial na via glicolítica do parasita, onde converte frutose-1,6-bifosfato em gliceraldeído-3-fosfato e di-hidroxiacetona-fosfato. Com natureza homotetramérica e tamanho aproximado de 160 kDa, encontra-se no citoplasma do parasita de forma ativa e solúvel, e ligada a membrana de forma insolúvel (MATHEMA & NA-BANGCHANG, 2015; RAGAVAN *et al.*, 2018).

P. vivax e *P. falciparum* contêm um tipo de isoenzima aldolase, com comprimento de 369 aminoácidos, onde são relativamente conservados seu nucleotídeo e sequências aminoácidas. A enzima é vital para a sobrevivência do parasita, sendo

considerada uma importante molécula alvo e potencial marcador no desenvolvimento de sensores de diagnóstico da malária (BUSCAGLIA *et al.*, 2007; JAIN *et al.*, 2014).

- **Glutamato Desidrogenase (GDH)**

O GDH é uma proteína solúvel metabólica do tamanho de aproximadamente 50 a 60 kDa, usada pelo parasita no plasma para obter energia via ciclo de Krebs, onde acontece a desaminação oxidativa reversível do L-glutamato em alfa-cetoglutarato e amônia, utilizando fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida (NADP) e liberando sua forma reduzida (NADPH) durante a fase intra-eritrocítica (RODRÍGUEZ-ACOSTA *et al.*, 1998; STORM *et al.*, 2011). Embora os parasitas da malária exibam várias isoformas do *p*GDH, exemplo: o *P. falciparum* exibe três tipos de isozimas, com um 23% de sequência idêntica à GDH humano; elas atuam como um biomarcador confiável e seletivo, que pode ser utilizado para detectar a doença e na produção de anticorpos para melhorar os ensaios imunodiagnósticos (KORI *et al.*, 2020; WAGNER *et al.*, 1998).

- **Hipoxantina-Guanina Fosforribosiltransferase (HGPRT)**

HGPRT é uma enzima importante envolvida no metabolismo da purina dos protozoários parasitários, convertendo nucleobases de purina livres (hipoxantina e guanina) em nucleotídeos, sendo o grupo fosforibosil derivado do pirofosfato de fosforibosil em uma reação que requer Mg^{2+}. *Pf*HGPRT compartilha 44% de sequências idênticas com HGPRT humano, e constitui um alvo terapêutico potencial para o desenvolvimento de medicamentos antiparasitários e métodos de diagnóstico (GOGIA *et al.*, 2011; RAMAN *et al.*, 2005).

- **Hemozoína**

A degradação da hemoglobina desempenha um papel vital como fonte de aminoácidos para os parasitas. Durante esse processo de digestão da hemoglobina nos glóbulos vermelhos, o heme é formado, considerado bastante tóxico para as células, que posteriormente é convertido pelo parasita em um produto não tóxico, vermelho-acastanhado, microcristalino, inerte e insolúvel denominado hemozoína (CORONADO *et al.*, 2014). Popularmente é denominado pigmento da malária, possui características únicas, usado como marcador visível para identificar os parasitas e atua como um biomarcador para o diagnóstico porque está ausente em indivíduos saudáveis (HEMPELMANN, 2007; JAIN *et al.*, 2014).

1.2. Testes para Detecção da Malária

O diagnostico rápido e preciso, seguido de um tratamento eficaz, constitui a principal estratégia para o controle de doenças. A OMS recomenda que todos os pacientes suspeitos de malária realizem teste de confirmação para o gerenciamento eficaz e a vigilância epidemiológica da doença (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010). Atualmente, várias abordagens de diagnóstico são empregadas em laboratórios, incluindo o uso de microscopia, testes rápidos de detecção e técnicas moleculares avançadas de amplificação de ácidos nucleicos (KERSTING *et al.*, 2014; TANGPUKDEE *et al.*, 2009; WONGSRICHANALAI *et al.*, 2007).

- **Microscopia de Luz Convencional**

O exame convencional consiste na análise microscópica de filmes grossos (para rastreamento do parasita) e finos (para confirmação de espécies) do sangue, colhido geralmente por punção digital e distribuídos adequadamente em lâminas de vidro, que posteriormente são coradas usando as manchas de Giemsa, Wright ou Field para visualizar os parasitas (BERZOSA *et al.*, 2018; WARHURST & WILLIAMS, 1996). A sensibilidade analítica esperada é de aproximadamente 50 - 100 parasitas/µL e se realizada por um microscopista experiente, pode alcançar até 5 parasitas/µL (TANGPUKDEE *et al.*, 2009).

O método é simples, de baixo custo, demanda cerca de 60 min, possibilita identificar a presença dos parasitas, as espécies infectantes e avaliar sua densidade. No entanto, a qualidade do diagnóstico tem certas limitações em muitas regiões endêmicas, incluindo a escassez de instalações laboratoriais, microscopistas qualificados e a possibilidade de erros de diagnóstico devido à baixa parasitemia ou infecções mistas (MOODY, 2002; MUKRY *et al.*, 2017).

- **Microscopia de Fluorescência**

A microscopia fluorescente baseada em diodos emissores de luz (do inglês *light-emitting diode,* LED) foi introduzida como um método alternativo na tentativa de melhorar a detecção de parasitas em filmes de sangue. Nesse método são usados corantes fluorescentes que têm afinidade com o ácido nucleico no núcleo do parasita, ligando-se aos núcleos e corando DNA e RNA instantaneamente. Posteriormente, o núcleo irá florescer quando são excitados pela luz ultravioleta no comprimento de onda apropriado (GUY *et al.*, 2007; KEISER *et al.*, 2002).

Os fluorocromos frequentemente usados para esse fim são o laranja de acridina e benzotiocarboxipurina, que excitados a 490 nm exibem fluorescência verde-maçã ou amarela. A técnica é rápida, precisa e constitui uma ferramenta muito útil em configurações de campo, pois o microscópio LED é duradouro, possui uma visão mais clara, consome menos energia e funciona com bateria. No entanto, uma importante limitação é sua incapacidade de diferenciar facilmente as diferentes espécies de *Plasmodium* (HATHIWALA *et al.*, 2017; LENZ *et al.*, 2011; MOODY, 2002).

- **Testes Rápidos de Detecção**

Os RDTs são testes de uso fácil, portáteis e oferecem resultados em curto tempo (20 min). O princípio do método é baseado na detecção de antígenos das espécies *Plasmodium* presentes no sangue periférico usando imunocromatografia de fluxo lateral. Estes são capturados por anticorpos monoclonais conjugados com um lipossoma contendo uma tinta de selênio ou com nanopartículas de ouro, que posteriormente migram pela fase móvel ao longo de uma fita de nitrocelulose e liga-se a um segundo anticorpo fixo sobre a fita (fase imóvel), observando-se uma linha visível como resultado positivo do teste (Figura 1.3).

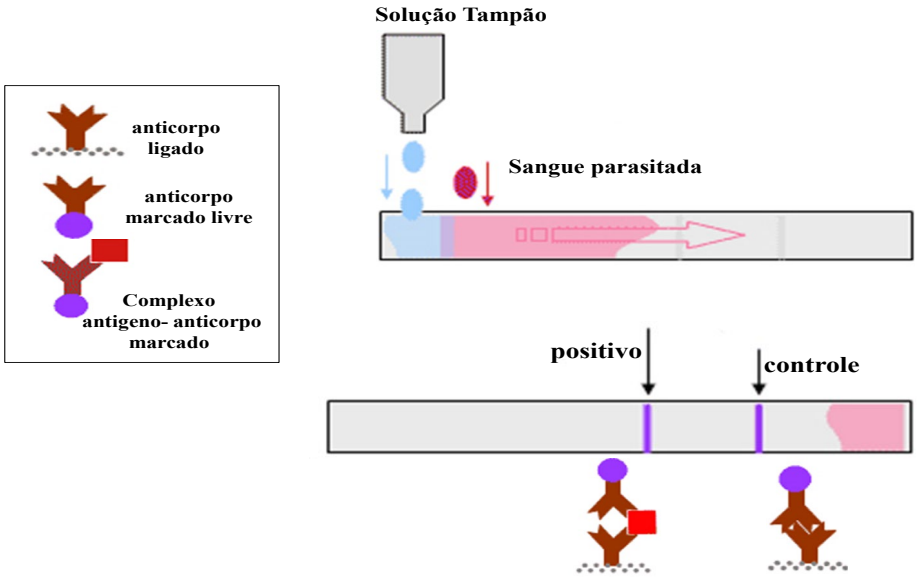

Figura 1.3. Mecanismo de ação dos testes de diagnóstico rápido [Adaptado de WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015b].

Geralmente as proteínas HRP2 e LDH são as mais detectadas, com aproximadamente entre 100 e 200 parasitas/µL e 75% de sensibilidade, dependendo da

variabilidade no uso, armazenamento e padronização do usuário final (MOODY, 2002; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015a).

- **Métodos Moleculares**

Os NAATs são métodos moleculares sensíveis que detectam a presença dos parasitas em infecções de baixa densidade (abaixo de 1 parasita/µL). Entre os principais métodos encontra-se: PCR (incluindo PCR aninhado, quantitativo ou transcrição reversa em tempo real), LAMP e amplificação quantitativa baseada em sequência de ácido nucleico. Estes métodos são baseados na amplificação de sequencias de dupla fita de DNA através de uma polimerase especializada, de modo tal que os produtos causam que a mistura da reação se torne turva quando é positiva. O método LAMP tem sido utilizado para a detecção dos *Plasmodium* no sangue, saliva e urina, mostrando resultados satisfatórios (GHAYOUR *et al.*, 2014; TANGPUKDEE *et al.*, 2009).

As principais funções do uso dos NAATs são a detecção qualitativa ou quantitativa de parasitas, determinação da multiplicidade de infecção, genotipagem para distinguir recrudescência de reinfecção e detecção de mutações de resistência a drogas. Algumas das desvantagens do método incluem alto custo, complexidade e maior tempo na realização do teste, fato pelo qual a OMS recomenda que sejam fundamentalmente usados para pesquisas ou acompanhados de outro tipo de teste (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019).

- **Outras Técnicas**

Outras técnicas como ensaios de imunoabsorção ligado à enzima (ELISA), espectrometria de massa e citometria de fluxo são empregados na realização de estudos soroepidemiológicos que precisam de informação sobre a imunidade, diagnósticos esporádicos em pacientes assintomáticos e triagem de bancos de sangue. A citometria de fluxo é baseada na detecção da hemozoína que pode ser detectada por despolarização da luz laser à medida que as células passam por um canal do citômetro de fluxo, fornecendo sensibilidade de 49 a 98% e especificidade de 82 - 97% (CAMPUZANO ZULUAGA & BLAIR TRUJILLO, 2016; TANGPUKDEE *et al.*, 2009).

O imunoensaio padrão para a detecção de HRP2 é o ELISA sanduíche, o qual usa anticorpos monoclonais para capturar e detectar os antígenos, e tem um limite de

detecção (LD) confiável aproximadamente de 1 ng mL^{-1} (KIFUDE *et al.*, 2008; ROGIER *et al.*, 2017).

1.3. Biossensores Eletroquímicos

1.3.1. Generalidades

Um sensor é definido como um dispositivo que emite um determinado sinal quando recebe um estímulo. Os sensores podem ser classificados em ópticos (luminescência, fluorescência e índice de refração), eletroquímicos (amperométricos, potenciométricos, impedimétricos e condutimétricos) e piezoelétricos, destacando-se os eletroquímicos pela simplicidade na análise, com sinais rápidos e confiáveis (MISTRY *et al.*, 2014).

Especificamente, os biossensores eletroquímicos são uma classe especial de sensores químicos baseados na transdução de sinais elétricos (corrente, tensão, impedância etc.) como resposta a eventos bioquímicos (reação enzima-substrato, interação antígeno-anticorpo etc.). Nesses casos, um eletrodo é o componente chave do sistema, sendo empregado como suporte sólido para imobilização de biomoléculas (enzimas, anticorpos, proteínas, aptâmeros ou ácidos nucleicos) e o movimento de elétrons (Figura 1.4) (FRADEN, 2010; LIM & AHM ED, 2016).

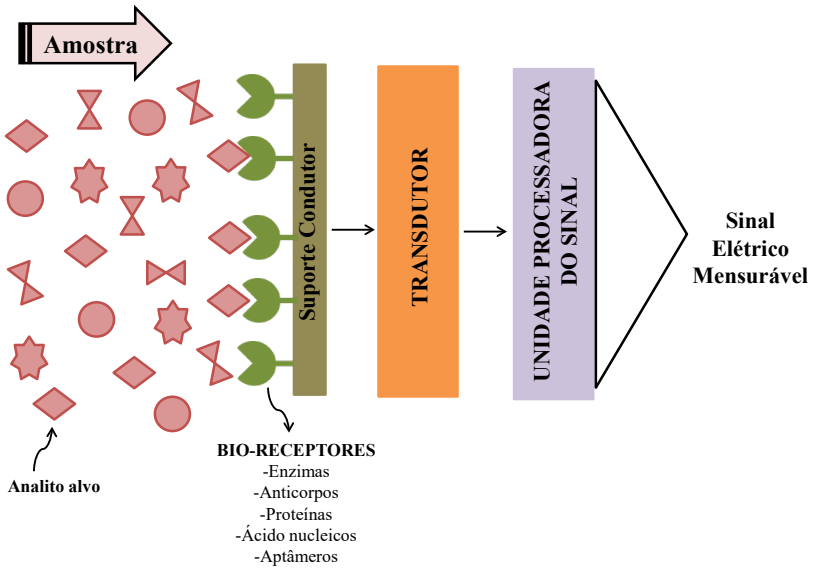

Figura 1.4. Representação esquemática da organização dos componentes funcionais de um biossensor eletroquímico.

Podem ser classificados em duas categorias: biocatalíticos e baseados em bioafinidade. Os primeiros usam enzimas como mediador biológico para catalisar uma

reação bioquímica de sinalização e o segundo grupo tem como fundamento a bio-afinidade, monitorando os processos de ligação entre as moléculas constituintes (LIM & AHMED, 2016).

Os elementos de bioreconhecimento influenciam no bom desempenho dos biossensores, razão pela qual alguns requisitos devem ser levados em conta para selecionar a camada que será usada como receptor, tais como: possuir sítio reativo com boa disponibilidade para interagir com o analito, possibilitar imobilização sobre determinados suportes através de métodos químicos sem afetar seu desempenho, apresentar estabilidade no meio e condições de medição (MEDEIROS DE ASSIS, 2019; SALGADO, 2001).

Além do mais, a resposta do dispositivo será determinada por outros fatores como: difusão do analito, produtos de reação, correagentes ou espécies interferentes e cinética do processo de reconhecimento. Para favorecer esses processos, muitos materiais com área superficial grande são utilizados para melhorar a capacidade de carga e o transporte de massa de reagentes, obtendo alto desempenho em termos de sensibilidade analítica (CHO *et al.*, 2020).

1.3.2. Imunossensores Eletroquímicos

Um imunossensor é definido como um tipo de biossensor baseado em afinidade, no qual um antígeno (Ag) atua como analito alvo específico, sendo detectado pela interação com um anticorpo (Ac) que atua como agente de captura, formando um imunocomplexo estável Ac-Ag, que resulta na geração de um sinal mensurável dado por um transdutor. Neste sistema a formação do imunocomplexo e o diagnóstico ocorrem na mesma plataforma, diferenciando-se assim dos imunoensaios (GHINDILIS *et al.*, 1998; MOLLARASOULI *et al.*, 2019).

Os métodos eletroquímicos aparecem como uma alternativa promissora, quando comparado com os métodos já existentes (exemplo: métodos ópticos), pois permitem usar a eletrônica moderna para a detecção de baixas concentrações de amostra usando volumes muito pequenos. Desde início do século XXI tem acontecido um auge no desenvolvimento dos imunossensores eletroquímicos, sendo amplamente utilizados nas diferentes áreas como agricultura, alimentos, controle de qualidade, vigilância ambiental e industrial e com aplicações médicas na detecção de doenças. Atualmente, muitas pesquisas são focadas no desenvolvimento de estratégias de amplificação de sinal, aumento dos limites de detecção (LD) e melhora da sensibilidade (LIM & AHMED, 2016; MOLLARASOULI *et al.*, 2019).

De forma geral, a principal estratégia para a fabricação dos imunossensores eletroquímicos consiste em imobilizar anticorpos de captura sobre um suporte condutor (CHO *et al.*, 2018). Várias abordagens podem ser utilizadas para a detecção do analito alvo, classificando-se em:

Imunossensores diretos: denominados livres de marcadores, são capazes de detectar diretamente as alterações físicas ou químicas que acontecem depois da adição do antígeno. Reações bioquímicas são produzidas, levando à formação do complexo Ac-Ag na superfície do transdutor que gera um sinal elétrico mensurável (Figura 1.5 A). Eles podem ser aplicados para análises rápidas e em tempo real e têm sido muito usados nas últimas décadas para o uso clínico. No entanto, efeitos significativos de adsorção inespecífica podem acontecer e influenciar na resposta (DANIELS & POURMAND, 2007; MOLLARASOULI *et al.*, 2019).

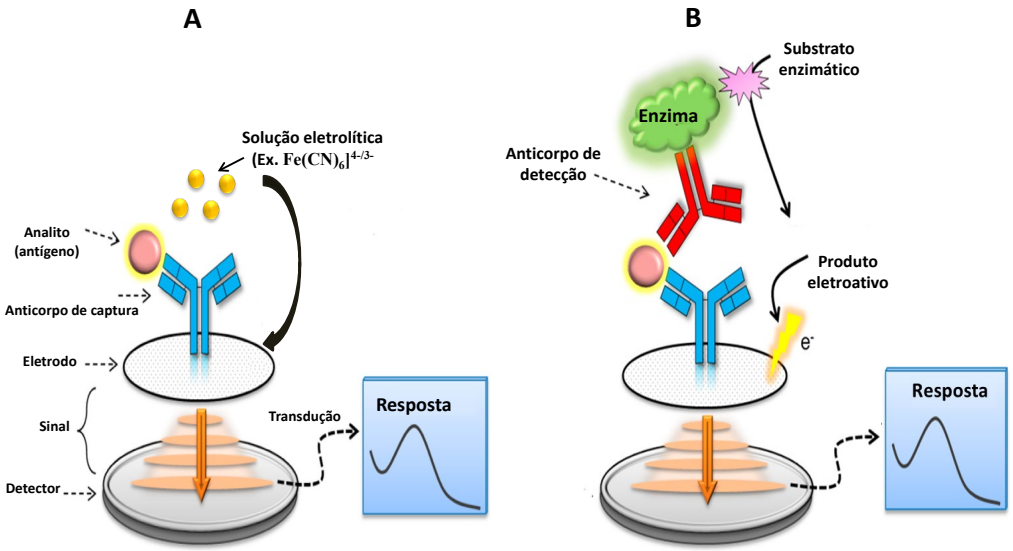

Figura 1.5. Componentes básicos de um imunossensor eletroquímico, baseados em duas estratégias de detecção. A: Detecção direta sem marcadores, e B: Detecção baseada em marcadores enzimáticos [Adaptado de CHO *et al.*, 2018].

Imunossensores indiretos: consistem em adicionar o antígeno e um segundo anticorpo geralmente marcado com uma enzima, acontecendo uma reação catalítica onde um produto eletroativo pode ser detectado pelo eletrodo, permitindo assim uma detecção versátil e altamente sensível, que estará associada a presença do antígeno específico (Figura 1.5 B).

Esta classe possui algumas vantagens, como maior sensibilidade e menor efeito de adsorção não específica no sinal (MOLLARASOULI *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2014).

1.3.3. Anticorpos

Os anticorpos são proteínas de estrutura tridimensional, com alta massa molecular (IgG ~150 kDa e IgY ~180 kDa), produzidas como parte da resposta imunitária do hospedeiro a micro-organismos estranhos como vírus, bactérias e parasitas, podendo ser identificadas através de rotas bioquímicas e purificadas para aplicação na fabricação de imunossensores devido a criação de um padrão de reconhecimento exclusivo com alta especificidade e precisão para o bio-analito (CRIVIANU-GAITA & THOMPSON, 2016).

De forma geral, os anticorpos compartilham uma tendência estrutural em forma de Y, composta por duas cadeias pesadas (H) e duas cadeias leves (L) ligadas entre si, mediante ligações dissulfídicas, com domínios de ligação do analito localizados nos braços. A região leve está formada por dois domínios (variável (VL) e constante (CL)), e a pesada, no caso das IgG, apresenta 1 cadeia de domínio variável (VH) e três de domínios constantes (CH1, CH2 e CH3), como mostrado na Figura 1.6 (GOPINATH *et al.*, 2014).

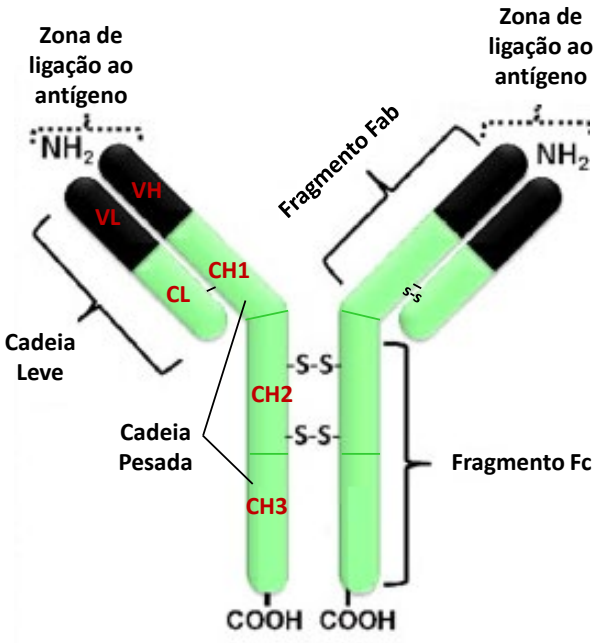

Figura 1.6. Representação da estrutura de um anticorpo (IgG), exibindo as diferentes regiões [Adaptado de GOPINATH *et al.*, 2014].

Existem vários tipos de anticorpos, denominados imunoglobulinas (Ig) e dentro delas podemos encontrar as IgG, que são mais abundantes no soro e comumente usadas no desenvolvimento de imunoensaios. Por outro lado, existem as IgY, que são para as aves o equivalente às IgG dos mamíferos e constituem uma fração importante da gema do ovo, oferecendo aos embriões e pintos (recém-nascidos) proteção contra patógenos. (LANZARINI *et al.*, 2018; RÉHAULT-GODBERT & GUYOT, 2018). As IgY possuem algumas vantagens sobre as IgG, referentes a alto rendimento e menor custo na obtenção. Nos últimos anos, a produção de anticorpos em aves (frangos) atraiu considerável atenção e numerosas IgY foram usados contra diversos antígenos, tanto para fins terapêuticos quanto para o desenvolvimento de imunoensaios (BRUNDA *et al.*, 2006; GANDHI *et al.*, 2009; KRAUSE *et al.*, 2015; THIRUMALAI *et al.*, 2019).

Embora os anticorpos continuem sendo o elemento de reconhecimento fundamental no desenvolvimento de biossensores, as limitações são amplamente conhecidas, como: processos de produção e purificação caros e demorados, que requerem experimentação com animais e precisam de instalações adequadas (MORALES & HALPERN, 2019).

1.3.4. Métodos de Imobilização de Biomoléculas

Os procedimentos de imobilização dos anticorpos na superfície do eletrodo desempenham um fator chave na resposta dos imunossensores; a escolha de uma estratégia apropriada e favorável é uma etapa importante para obter um dispositivo com alto desempenho, estabilidade e aplicabilidade. É fundamental que o anticorpo imobilizado mantenha atividade biológica, forneça boa orientação em termos de locais de ligação expostos ao analito alvo e adequada densidade (MOLLARASOULI *et al.*, 2019). Vários métodos são amplamente utilizados com este fim:

Adsorção: é a técnica mais simples para a imobilização, baseada em interações não covalentes (interações eletrostáticas, ligação de hidrogênio, Van der Waals e interação hidrofóbica) entre o bioelemento e a superfície do dispositivo, sendo adsorvido fisicamente ou fixado no material. Esta metodologia é muito utilizada; no entanto, é preciso um controle exaustivo da orientação dos anticorpos, que podem ficar orientados de forma aleatória (dependendo dos momentos dipolares dos mesmos e das cargas superficiais dos suportes) e ter pouca afinidade com os antígenos, resultando uma retenção relativamente baixa (SHEN *et al.*, 2017; ZHAO *et al.*, 2012).

Encapsulamento: este procedimento incorpora as biomoléculas dentro de um gel ou polímero, formando uma matriz tridimensional. A biomolécula não interage quimicamente com o polímero, portanto, a probabilidade de desnaturação é pouca. O método permite modificar o material de encapsulamento e criar um ambiente ideal para a molécula e o polímero. O método de captura possui mais estabilidade em comparação com o procedimento de adsorção física. Apresenta algumas vantagens como simplicidade, transparência óptica, alta estabilidade térmica, porosidade ajustável, rigidez mecânica e baixa reatividade química. No entanto, quando são usados anticorpos como elemento a imobilizar, a orientação aleatória é um fator que precisa ser analisado (MOHAMAD *et al.*, 2015; SASSOLAS *et al.*, 2012).

Covalente: a ligação covalente é o método mais utilizado para a imobilização de anticorpos em superfícies sólidas ativadas quimicamente. Os grupos amino dos anticorpos podem ser facilmente acoplados à grupos funcionais aldeído, epóxi e *N*-hidroxisuccinimida, que são usados para modificar os eletrodos. Além disso, podem formar-se monocamadas automontadas, baseadas em ligações entre grupos sulfetos, dissulfetos ou tióis com superfícies metálicas nobres (ouro, prata ou platina). Também anticorpos funcionalizados com compostos tiol podem ser facilmente imobilizados em superfícies de ouro (JUNG *et al.*, 2008; MOLLARASOULI *et al.*, 2019). Vários fatores químicos devem ser considerados para uma exitosa ligação covalente, como funcionalidade do substrato, grupos funcionais no anticorpo e algumas condições físicas como pH, temperatura e grau de conjugação. O método de ligação covalente para imobilizar proteínas constitui um procedimento estável e possui melhor imobilização orientada (LIU & YU, 2016; WELCH *et al.*, 2017).

Ligação por bioafinidade: é baseada na utilização de peptídeos, como a proteína A ou G, que são pequenas proteínas bacterianas que se ligam especificamente às regiões Fc dos anticorpos, permitindo a obtenção de imobilização orientada no suporte sólido. Outra estratégia, é a modificação de anticorpos com marcadores como biotina, os quais podem ser fortemente imobilizados sobre superfícies revestidas com estreptavidina. Este sistema tem uma interação forte e resistente a altas temperaturas, variações de pH e exposição a produtos químicos (DE MORAES, 2019; JAROCKA *et al.*, 2014; SCHROEDER *et al.*, 2019).

Ligação cruzada: é usada fundamentalmente para a imobilização de enzimas, através de reticulação (glutaraldeído, glioxal ou hexametilenodiamina). A enzima pode ser reticulada entre si ou na presença de uma proteína inerte (exemplo: albumina de soro bovino

(BSA)). Este método é atraente devido a sua simplicidade e forte ligação química obtida entre as biomoléculas. A principal desvantagem é a possibilidade de perdas de atividade devido a distorção da conformação enzimática ativa e as alterações químicas do local ativo durante a reticulação (SASSOLAS *et al.*, 2012).

1.3.5. Materiais Usados na Imobilização das Biomoléculas

- **Dihexadecil Fosfato (DHP)**

O DHP, molécula com fórmula linear $[CH_3(CH_2)_{15}O]_2P(O)OH$, é classificado como um tipo especial de tensoativo hidrofóbico, constituído por uma parte polar com carga negativa (cabeça), onde se encontra localizado um grupo fosfato e ligado a ele, duas longas cadeias carbonadas hidrofóbicas. A organização estrutural acontece em forma de bicamadas, muito semelhantes às dos lipídeos, sendo capaz de formar um revestimento estável na superfície dos eletrodos (COSTA GARCIA *et al.*, 2013; JANEGITZ *et al.*, 2015).

Estas características fazem com que o material possa ser disperso em solventes aquosos e orgânicos, com utilização de banho ultrassônico, resultando em uma dispersão estável e homogênea, com aspecto de gel ou cristal líquido, que pode ser utilizada para a preparação de filmes finos. Em muitos casos a formação do filme ocorre após a evaporação do solvente e provavelmente causada pelas ligações de hidrogênio (VICENTINI *et al.*, 2013).

O DHP tem sido amplamente utilizado no desenvolvimento de sensores e biossensores, que geralmente, com o objetivo de melhorar as propriedades elétricas é misturado com nanomateriais como nanotubos de carbono (NTC), oxido de grafeno, nanopartículas de ouro, platina, NiO ou MnO_2, entre outros (BORTOLUCCI SIMIONI *et al.*, 2017; CAMPANHÃ VICENTINI *et al.*, 2016, 2014).

- **Nanotubos de carbono**

Os NTC são estruturas formadas por átomos de carbono e organizados de forma cilíndrica. São considerados fibras rígidas e fortes que apresentam excelentes propriedades mecânicas, elétricas, ópticas e basicamente estão divididos em dois tipos: de parede única e de paredes múltiplas. Pelas suas características e propriedades (excelente resistência, condutividade elétrica e térmica, alta área superficial e eletroquimicamente estável em soluções aquosas e não aquosas), durante os últimos anos vêm sendo amplamente aplicados

nas pesquisas de desenvolvimento de dispositivos biomédicos para lograr um melhor desempenho (LI *et al.*, 2009; SIREESHA *et al.*, 2018).

Os NTC são modificados com vários grupos funcionais através de diferentes estratégias. Geralmente, são usados métodos de oxidação (tratamento com ácidos ou bases com subsequentes reações de amidação ou esterificação para introduzir as biomoléculas ou compostos orgânicos), métodos por ligação não covalente (exposição a vapores contendo o material a ser funcionalizado) e métodos por ligação covalente (usando agentes de acoplamento via formação de éster estável, que se acopla as biomoléculas com boa estabilidade e acessibilidade). Esta última abordagem é frequentemente utilizada e seus produtos são aplicados no desenvolvimento de biossensores (DI GIOSIA *et al.*, 2019; GLORIA *et al.*, 2020; NAGARAJU *et al.*, 2015).

- **Polímeros Condutores**

Os polímeros condutores (CPs) abriram uma nova era para o desenvolvimento dos polímeros e suas aplicações nas pesquisas sensoriais, apresentando inúmeras vantagens como alta sensibilidade, tempo de resposta curto, operação em temperatura ambiente e modificando as condições experimentais é possível ajustar suas propriedades químicas e físicas. Além disso, são de massa leve, resistentes à corrosão, apresentam excelentes propriedades elétricas, mecânicas, ópticas e de condução e alguns deles são de baixo custo. (NAVEEN *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2020).

Os CPs são estruturas de cadeia conjugadas que geralmente no seu estado original são semicondutores, e dopados (oxidação e redução de sistemas π conjugados) podem se tornar mais condutores. O processo de obtenção dos CPs pode ser controlado por métodos químicos (oxidação do monômero usando agentes oxidantes) ou eletroquímicos (aplicando um potencial ou corrente) (NEZAKATI *et al.*, 2018).

No caso da eletropolimerização, os compostos podem ser oxidados a radicais catiônicos estáveis e o acoplamento de dois radicais ou um radical e um monômero, com a sucessiva remoção de dois prótons resulta na formação de um dímero. A reação envolve um processo eletroquímico de oxidação e um processo químico de acoplamento e eliminação de prótons. Posteriormente a oxidação do dímero e acoplamento produz oligômeros (solúveis em eletrólitos e eletroativos para polimerização), que são amplificados através dos mesmos procedimentos resultando no produto final (LI *et al.*, 2009; SADKI *et al.*, 2000). Entre os

CPs utilizados com maior frequência no desenvolvimento de sensores encontra-se o politiofeno, a polianilina, o polipirrol (do inglês *polypyrrole*, PPy), e seus derivados.

O PPy é um dos polímeros mais estudados devido à sua fácil síntese, estabilidade na forma oxidada, alta condutividade elétrica e boas propriedades redox. Encontra-se carregado positivamente em sua forma oxidada, sendo bom condutor. No entanto, com a superoxidação perde carga e propriedades condutoras. Já em estado neutro é fraco mecanicamente e isolante. A síntese pode ser realizada em temperatura ambiente e usando uma ampla variedade de solventes, resultando em materiais com diferentes porosidades e grande área superficial. Além do mais, pode ser facilmente modificado através da incorporação de moléculas bioativas com possível aplicação nas áreas biomédicas (DESHMUKH *et al.*, 2017; JAIN *et al.*, 2017; KHODER & KORRI-YOUSSOUFI, 2020).

O mecanismo de eletropolimerização do pirrol está representado na (Figura 1.7) (DUBAL *et al*, 2012; SADKI *et al.*, 2000).

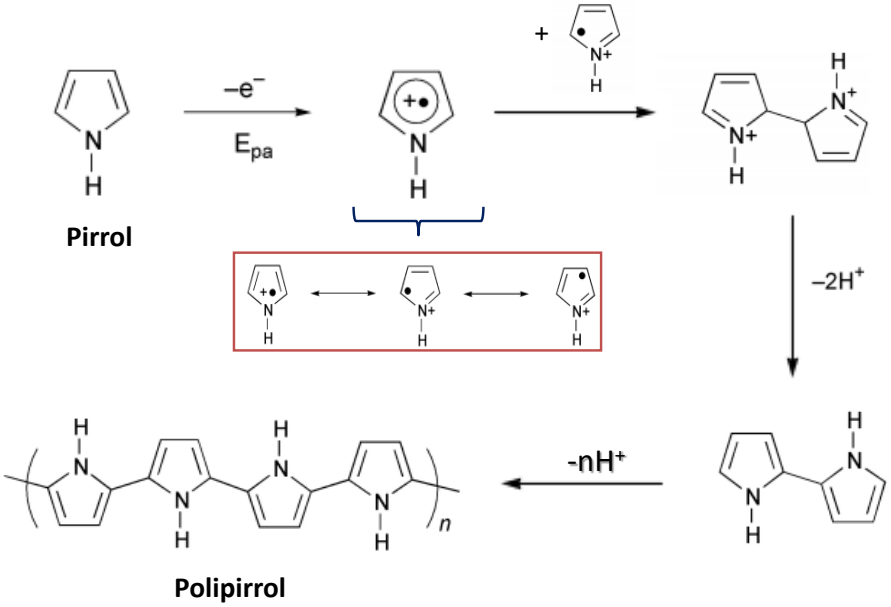

Figura 1.7. Mecanismo de eletropolimerização do pirrol [Adaptado de SADKI *et al.*, 2000].

Por outro lado, alguns de seus derivados com grupos carboxílicos funcionais podem ser usados para acoplar à superfície moléculas contendo grupos amida, por meio de reações com cloridrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N′-etilcarbodiimida (EDC) e N-hidroxisuccinimida (NHS). Esta abordagem foi reportada por vários autores para o desenvolvimento de imunossensores (TERTIS *et al.*, 2018; YUAN *et al.*, 2015).

- **Monocamadas Automontadas**

As monocamadas automontadas (do inglês *self-assembled monolayer,* SAMs*)* são arranjos moleculares ordenados de forma bidimensional e altamente orientados, formados espontaneamente na superfície de uma variedade de substratos. Mediante esta modificação é possível fixar biomoléculas por meio de ligações covalentes, o que constitui uma vantagem em termos de estabilidade e orientação quando comparado a outros métodos como adsorção ou ligação cruzada. Para a formação das SAMs podem ser utilizadas pequenas moléculas como tioles e silanos (CASALINI *et al.*, 2017).

Devido às propriedades únicas do ouro, como inércia, facilidade de padronização e biocompatibilidade, este material condutor é amplamente utilizado para a preparação de SAMs. O ouro tem alta afinidade com moléculas contendo enxofre e sua superfície pode ser modificada pela adsorção de compostos que contêm grupos organo-sulfurados, como tióis (HS – R – X), formando uma ligação forte Au-S (Figura 1.8) (ULMAN, 1996).

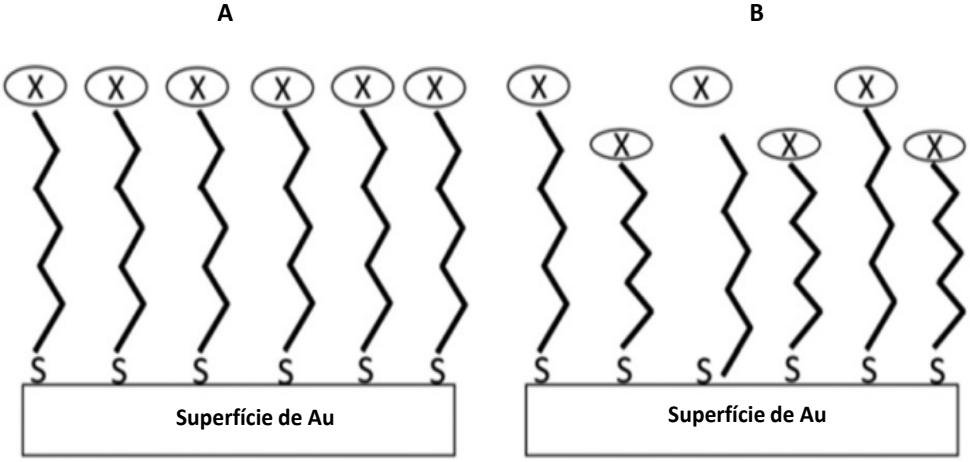

Figura 1.8. Formação de SAMs sobre a superfície de ouro A: usando um composto tiol, e B: usando uma mistura de dois tioles [Adaptado de SINGH *et al.*, 2020].

Atualmente, a utilização das SAMs para funcionalização de superfícies é considerada altamente atraente e versátil, especialmente para imobilização de biomoléculas e fabricação de novas arquiteturas supramoleculares. Nesta estratégia, diferentes grupos funcionais podem ser gerados na superfície dos substratos condutores para posterior imobilização de anticorpos, peptídeos, proteínas ou enzimas. Devido à simplicidade do processo de formação e não exigência de instrumentos caros, esta abordagem é proeminente

entre os pesquisadores que trabalham na área de funcionalização de superfícies e fabricação de dispositivos de sensoriamento (SINGH *et al.*, 2020).

1.4. Técnicas Eletroquímicas

As técnicas eletroanalíticas vêm sendo utilizadas ao longo das últimas décadas para monitorar com precisão a resposta de dispositivos eletrônicos que quantificam processos biológicos ou bioquímicos. Inicialmente, os analitos mais detectados eram compostos químicos básicos como glicose ou ureia, e posteriormente foram aplicados à detecção de macromoléculas como células inteiras, proteínas, vírus e bactérias. Atualmente, é possível acompanhar interações Ac-Ag, detectar marcadores tumorais, DNA etc. Algumas das técnicas são baseadas na mudança das propriedades da solução devido à produção/consumo de elétrons, onde o processo depende da atividade da espécie, e outras se concentram em analisar as alterações da superfície do eletrodo decorrentes da bio-funcionalização e interações moleculares. O fato de transformar uma interação biológica em um sinal elétrico e a existência de vários materiais que podem ser utilizados como eletrodos, torna as técnicas eletroquímicas muito atraentes para o desenvolvimento de sensores (DZIĄBOWSKA *et al.*, 2017) .

A voltametria cíclica, voltametria de pulso diferencial e espectroscopia de impedância eletroquímica são algumas das técnicas utilizadas com maior frequência (GRIESHABER *et al.*, 2008; REZAEI & IRANNEJAD, 2019). A voltametria baseia-se na medida da corrente em uma célula eletroquímica sob condições de completa polarização de concentração, na qual a velocidade de oxidação ou redução do analito é limitada pela velocidade de transferência de massa do analito para a superfície do eletrodo. Existem vários tipos de voltametria, que serão classificados dependendo do tipo de sinal de excitação empregado (SKOOG *et al.*, 2006):

- **Voltametria Cíclica**

A voltametria cíclica (do inglês *cyclic voltammentry*, CV) usa uma forma de onda potencial triangular (Figura 1.9 A), onde inicialmente o potencial é varrido linearmente ao longo do tempo, resultando em uma espécie química que sofre oxidação ou redução na superfície do eletrodo gerando uma corrente elétrica. Variando a velocidade da varredura do potencial é possível monitorar as diferenças na resposta de corrente e medir parâmetros cinéticos importantes (BRETT & BRETT, 1993).

Para uma reação de oxidação, o potencial do eletrodo é varrido em direção positiva, onde acontece a oxidação da espécie redox ativa e resulta em uma corrente oxidativa (anódica). À medida que o potencial aumenta através do potencial de meia onda ($E_{1/2}$), a oxidação se torna termodinamicamente favorável e a corrente atinge o valor máximo (Ipa), até que o processo se torne limitado pela difusão das espécies para a superfície do eletrodo, resultando em uma cauda caracterizada por uma queda na corrente. Em seguida, a varredura de potencial é revertida na direção oposta até que o potencial inicial seja alcançado. Neste processo ocorre a redução das espécies geradas eletroquimicamente, registrando correntes de redução (catódica) e atingindo um valor máximo (Ipc) (Figura 1.9 B) (BRETT & BRETT, 1993; SANDFORD *et al.*, 2019).

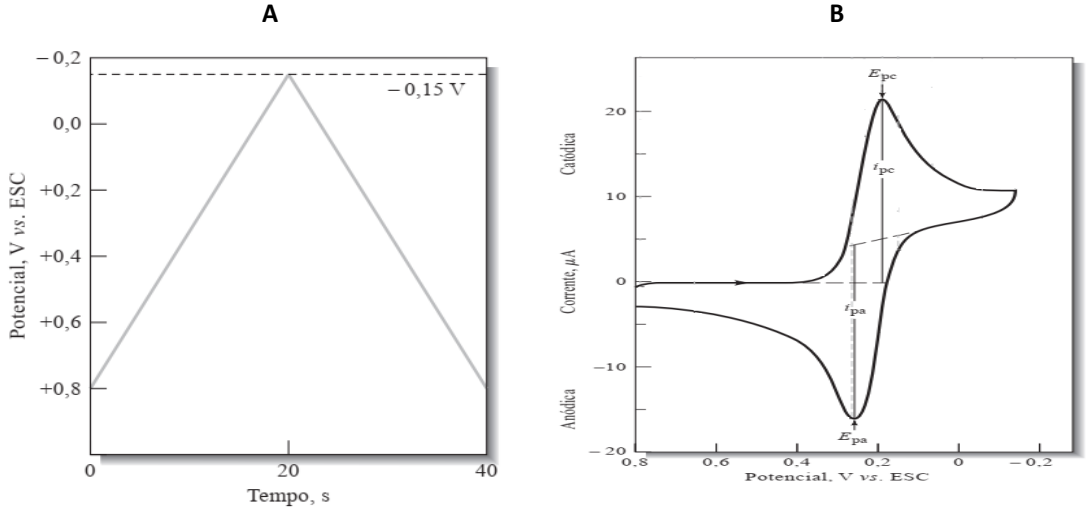

Figura 1.9. A: Sinal de excitação em CV, B: Voltamograma cíclico para um sistema reversível [Adaptado de SKOOG *et al.*, 2006].

Os parâmetros extraídos da CV (dependendo do tipo de voltamograma) geram informações qualitativas dos processos eletroquímicos sob diferentes condições, tais como reversibilidade do sistema, elucidação de mecanismos de reação, detecção de reações acopladas, identificação de espécies presentes em solução, intermediários e análise semiquantitativa das velocidades de reação (BRETT & BRETT, 1993; SKOOG *et al.*, 2006). As principais características dos diferentes sistemas redox são brevemente descritas na Tabela 1.1.

Tabela 1.1. Principais sistemas eletroquímicos em CV (WANG, 2006).

Sistema	Características	Parâmetros
Reversível	-A velocidade da reação de transferência de carga é elevada e a etapa de transferência de massa controla o processo; -Têm equilíbrio dinâmico na interface do eletrodo; -Segue a equação de Nernst	$I_p \propto \nu^{1/2}$; $I_{pa}/I_{pc} = 1$; E_p independente de ν; ΔE_p = Epa-Epc=59/n (mV).
Quase-Reversível	-A corrente é controlada pela transferência de massa e carga; -A equação de Nernst é aproximadamente satisfeita.	$I_p \propto \nu$; $I_{pa}/I_{pc} = 1$; se $\alpha = 1$; Ep é dependente de ν e se desloca negativamente com aumento de ν; $\Delta E_p > 59/n$ (mV).
Irreversível	-A corrente é controlada somente pela transferência de carga, a qual é lenta; -Não segue a equação de Nernst.	Ausência de pico reverso; $I_p \propto \nu^{1/2}$; Ep depende de ν; $\lvert Ep - E_{p/2} \rvert = (48/n\alpha)$.

- **Voltametria de Pulso Diferencial**

Na voltametria de pulso diferencial (do inglês *differential pulse voltammentry*, DPV) é escolhido um valor de potencial base (normalmente onde não há reação faradaica) e aplicado ao eletrodo. A partir deste valor são aplicados pequenos pulsos de crescente amplitude, sendo o aumento de amplitude sempre igual. O potencial base é aumentado entre os pulsos, sendo estes aumentos iguais. A corrente é medida imediatamente antes e no fim da aplicação do pulso, registrando a diferença entre as duas correntes. A resposta é semelhante à primeira derivada de um voltamograma diferencial, isto é um pico. O potencial de pico (Ep) pode ser identificado aproximadamente com o potencial de meia onda ($E_{1/2}$). Com aumento da irreversibilidade, o Ep se afasta do $E_{1/2}$ ao mesmo tempo que aumenta a largura do pico e a sua altura diminui (BRETT & BRETT, 1993).

A Figura 1.10 A e B representa a forma de aplicação do sinal de excitação e a curva resultante (forma gaussiana), respectivamente. As variações na intensidade da corrente de pico podem estar relacionadas as características ou modificações dos sistemas em estudo, fato pelo qual esta técnica é das mais usadas com fins de quantificação de analitos, apresentando alta sensibilidade. A maior sensibilidade da técnica pode ser atribuída a duas fontes: uma melhora da corrente faradaica ou uma diminuição na corrente de carga não-faradaica (SCOTT, 2016; SKOOG *et al.*, 2006)

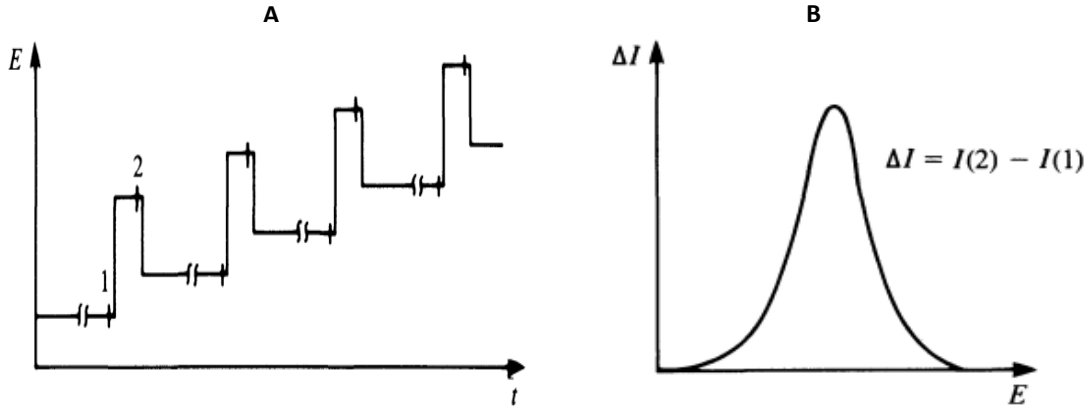

Figura 1.10. Voltametria de pulso diferencial. A: Esquema de aplicação de potenciais (algumas vezes sobrepostos numa rampa, em vez de uma escada). B: Perfil esquemático de ΔI *vs* E [Adaptado de BRETT & BRETT, 1993].

- **Espectroscopia de Impedância Eletroquímica**

A espectroscopia de impedância eletroquímica (do inglês *electrochemical impedance spectroscopy*, EIS) é baseada na aplicação de uma perturbação, geralmente senoidal (potencial ou corrente alternada) em diferentes valores de frequência, onde uma variável é controlada e a diferença em fase e amplitude da outra é registrada. As medições de EIS permitem analisar os processos do eletrodo em relação as contribuições da difusão, da cinética, da dupla camada, de reações homogêneas acopladas etc. A técnica constitui uma útil ferramenta no estudo das propriedades intrínsecas de materiais que são usados como transdutor no desenvolvimento de biossensores (BRETT & BRETT, 1993; GRIESHABER *et al.*, 2008).

Assim como a resistência (R), a impedância (Z) é uma medida da capacidade de um circuito de resistir ao fluxo de corrente elétrica, mas não é limitada pelas propriedades simplificadoras de um resistor ideal. Sendo também medida em ohm, Z= $E(t)/I(t)$. Os resultados das medições podem ser representados em gráficos de Nyquist ou Bode (Figura 1.11 A - C). No primeiro são dispostos os valores de impedância imaginaria *vs* impedância real, onde a frequência alcança o valor máximo ao final do semicírculo à esquerda, e na outra extremidade o valor mínimo. Já o diagrama de Bode, representa a fase *vs* logaritmo da frequência e |Z| *vs* logaritmo da frequência (LASIA, 2014).

As transformações eletroquímicas que acontecem na interface eletrodo/solução podem ser modeladas usando componentes dos circuitos eletrônicos equivalentes que correspondem aos espectros de impedância experimentais. O circuito de Randles é um dos

mais utilizados, incluindo a capacitância da dupla camada (Cd), a resistência ôhmica da solução eletrolítica (Rs), a resistência de transferência de elétrons (Rct) e a impedância de Warburg (W), resultante da difusão de íons da solução para a superfície do eletrodo (Figura 1.11 D).

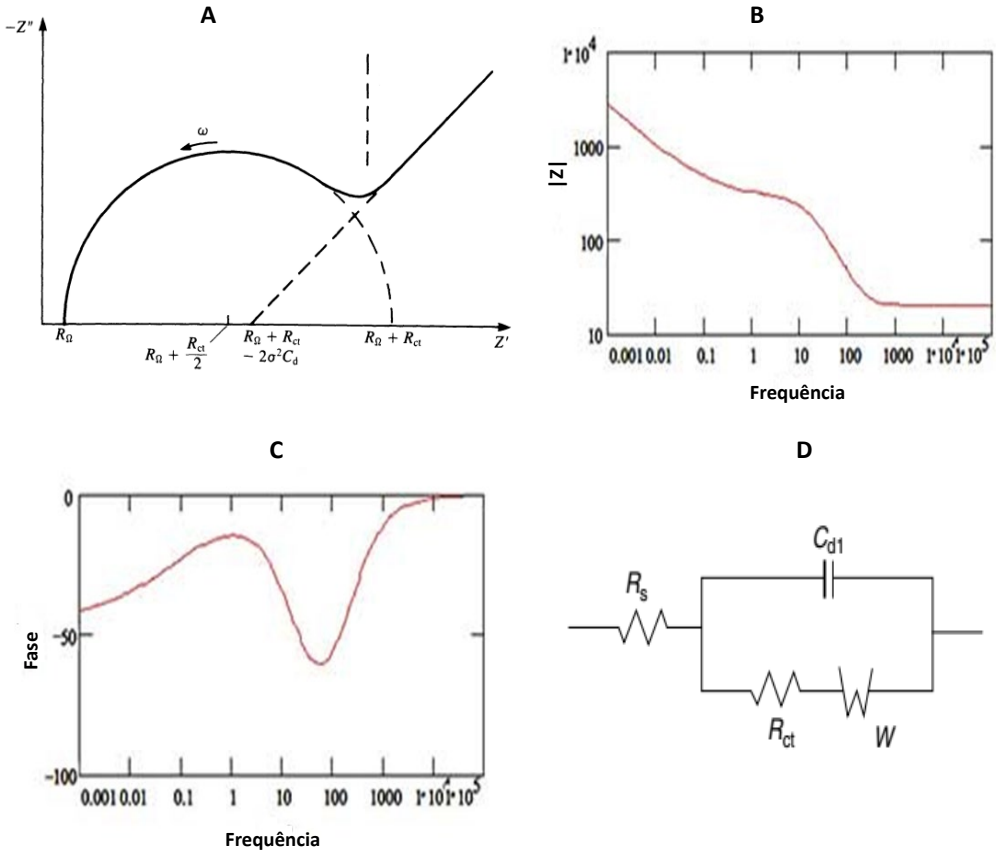

Figura 1.11. Representação das medidas de EIS. A: Gráfico de Nyquist, B e C: Gráfico de Bode (impedância e fase, respectivamente), e D: Circuito equivalente de Randles (com controle de transferência de carga e controle cinético) [Adaptado de GAMRY INSTRUMENTS, 2010].

1.5. Biossensores Eletroquímicos para a Detecção da Malária

Na última década, o desenvolvimento de biossensores eletroquímicos aplicados à detecção de biomarcadores da malária tem sido amplamente abordado, sendo exploradas diferentes metodologias de construção (DUTTA, 2020; RAGAVAN *et al.*, 2018). A seguir são brevemente mencionados alguns dos principais estudos reportados na literatura para a detecção eletroquímica das proteínas HRP2 e LDH de *plasmodium*:

Paul e colaboradores (2016) desenvolveram uma plataforma de sensoriamento baseada em eletrofiação de nanofibras de óxido de zinco dopadas com cobre. A superfície foi funcionalizada com ácido mercaptopropilfosfônico para a formação de monocamadas automontadas e posterior ligação covalente dos anticorpos. A resposta impedimétrica do biossensor mostrou excelente sensibilidade nas faixas de detecção de 10 ag mL^{-1} a 10 mg mL^{-1} e um LD de 6 ag mL^{-1}. Além disso, o biossensor proposto é altamente seletivo para a proteína *Pf*HRP2, sem interferências de outros componentes presentes nas amostras reais.

Hemben e colaboradores (2017) reportaram um imunossensor cronoamperométrico para detectar *Pf*HRP2. Os anticorpos monoclonais (Anti-*Pf*HRP2) foram imobilizados pelo método de adsorção sobre a superfície de eletrodos impressos de ouro. Para a detecção do antígeno foi construído um formato similar ao ensaio ELISA sanduíche, usando a enzima peroxidase de rábano e uma solução de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB)/peroxido de hidrogênio. O LD atingido para amostras de PBS e soro enriquecidas com o antígeno foram de 2,14 ng mL^{-1} e 2,14 ng $mL^{-1,}$ respectivamente. Além disso, o sinal foi amplificado usando nanopartículas de ouro conjugadas a uma amostra de anticorpos-enzima, registrando um LD de 36 pg mL^{-1} nas amostras tampão e 40 pg mL^{-1} nas amostras de soro.

Dutta e colaboradores (2017) fabricaram um imunossensor sem enzimas, usando um esquema de detecção competitivo baseado em azul de metileno (AM), hidrazina e nanopartículas de platina (Pt). O sistema emprega um formato de ensaio sanduíche, onde o anticorpo de captura é imobilizado sobre um eletrodo de ITO (*índium tin oxide*) e o anticorpo de detecção é marcado com AM. Na presença do *Pf*HRP2, o complexo $Ac_{(1)}$/Ag/$Ac_{(2)}$-AM imobilizado na superfície do eletrodo consumiu hidrazina interfacial e diminuiu a eletro-oxidação da hidrazina sobre as nanopartículas. As medições quantitativas foram realizadas por cronocoulometria em solução tampão (PBS) e amostras reais (saliva), com LD de 1 pg mL^{-1} e 2,2 pg mL^{-1}, respectivamente.

Paul e colaboradores (2017) relataram a fabricação de um biossensor flexível, leve e descartável para a detecção do antígeno *Pf*HRP2. Eletrodos de ouro foram fabricados sobre tereftalato de polietileno e em seguida nanofibras de NTC-óxido de zinco foram sintetizadas por eletrofiação. Esta abordagem cria os grupos funcionais na superfície das nanofibras que foram usados para a imobilização dos anticorpos (Anti-*Pf*HRP2). O

dispositivo exibiu boa sensibilidade, uma ampla faixa de detecção (10 fg mL^{-1} - 10 ng mL^{-1}) e é específico para o analito alvo.

Hemben e colaboradores (2018) descreveram o desenvolvimento de um biossensor de afinidade para a detecção de *Pf*LDH. Eletrodos impressos de ouro foram funcionalizados com Anti-*Pf*LDH e usadas nanopartículas de ouro conjugadas ao sistema anticorpo secundário/peroxidase de rábano para obter melhoras na resposta eletroquímica. O LD alcançado foi de 9 pg mL^{-1} em solução tampão PBS e 23 pg mL^{-1} em amostras de soro, ambas incrementadas com o antígeno. O desempenho do biossensor foi comparado aos kits comerciais para malária, demostrando boa sensibilidade e reprodutibilidade.

Chakma e colaboradores (2018) publicaram um aptassensor para detecção de *Pf*HRP2. Nesta plataforma, monocamadas foram automontadas mediante ligação dos grupos tiol (SH) do reagente de Lomant (*dithiobis succinimidyl propionate*) à superfície de eletrodos de disco de ouro. Um aptâmero ssDNA contra o *Pf*HRP2 foi previamente sintetizado e imobilizado no eletrodo modificado. A resposta eletroquímica foi estudada por EIS e o aumento da impedância se comportou de forma proporcional ao aumento da concentração, na faixa de 1 pmol L^{-1} a 500 pmol L^{-1} com LD de 3,15 pmol L^{-1}, sendo possível detectar casos de malária assintomática, não complicada e complicada.

Figueroa-Miranda e colaboradores (2018) reportaram um aptassensor impedimétrico para determinação de *Pf*LDH. A plataforma foi fabricada por imobilização do aptâmero 2008s em eletrodos de ouro. A faixa de detecção foi adaptável em diferentes valores de pH entorno ao ponto isoelétrico da proteína, com boa resposta no intervalo de 10 fmol L^{-1} a 10 nmol L^{-1}, sendo o LD de 0,84 pmol L^{-1}. Além disso, o aptassensor construído pode ser facilmente regenerado, simplesmente enxaguando com uma solução de ureia (6 mol L^{-1}) como agente desnaturante.

Low e colaboradores (2019) fabricaram um imunossensor impedimétrico ultrassensível para a detecção de *p*LDH. Eletrodos interdigitados foram feitos mediante deposição de ouro, cromo e titânio sobre vidro borossilicato por litografia ultravioleta. A plataforma do biossensor consistiu na imobilização de anticorpos (Anti-*p*LDH) sobre os eletrodos modificados com 3-aminopropil tri-etoxisilano e glutaraldeído. A detecção foi realizada em amostras de PBS e saliva incrementadas com *p*LDH, onde foram obtidos LD de 250 pg mL^{-1} e 2,5 ng mL^{-1}, respectivamente.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Material Biológico

As biomoléculas utilizadas: *Pf*HRP2, *Pv*LDH, anticorpos tipo IgG (Anti-*Pf*HRP2) e anticorpos tipo IgY (Anti-*Pf*HRP2 e Anti-*Pv*LDH) foram produzidas no Instituto Leônidas e Maria Deane da Fundação Oswaldo Cruz (ILDM/ Fiocruz Manaus). As amostras do soro humano para a realização dos testes em amostras reais foram obtidas do banco de amostras da FioCruz, Manaus. Os estudos foram aprovados pelo Comitê Ético Animal do Brasil (CEUA-UFAM 005/2010) e pelo Comitê Ético de Pesquisa em Humanos da Universidade Federal do Amazonas (CAAE 00622218.3.0000.5020).

As proteínas recombinantes *Pf*HRP2 e *Pv*LDH foram obtidas em trabalhos anteriores e o processo de preparação consistiu na inserção por eletroporação dos respetivos plasmídeos de expressão em células bacterianas (*Escherichia coli* BL21(DE3) pLysS) (Invitrogen, Thermo Scientific, Estados Unidos de América (E.U.A)). A purificação foi realizada em colunas de níquel por cromatografia de afinidade (Qiagen, Alemanha) e quantificadas utilizando curva padrão de BSA pelo método de reagente de Bradford e conservadas a -20 °C (SOUSA *et al.*, 2014).

Para a obtenção dos anticorpos tipo IgG (Anti-*Pf*HRP2), camundongos foram imunizados com a proteína recombinante purificada (*Pf*HRP2) (4 doses de 10 µg, bisemanais). O soro dos camundongos imunizados foi submetido à purificação por afinidade em coluna de "Proteína A". Em seguida, os anticorpos foram eluidos da coluna e a presença de proteínas nas eluições foi monitorada pelo método de Bradford.

No caso dos anticorpos tipo IgY (Anti-*Pf*HRP2 e Anti-*Pv*LDH), galinhas poedeiras (raça *Dekalb White)* com 7 semanas de idade foram imunizadas com os peptídeos (*Pf*HRP2 ou *Pv*LDH)) acoplados a NTC solubilizados. Seguidamente os anticorpos policlonais foram extraídos das gemas de ovo e purificados usando uma coluna especifica que foi fabricada pela imobilização de cada antígeno em resinas "*AminoLink Coupling Resin*" (Thermo Scientific, E.U.A), seguindo o manual do fabricante (1 - 2 mg de peptídeo e proteína foram acoplados a 1 mL de resina). Os anticorpos resultantes da purificação foram dialisados, liofilizados, resuspendidos em água ultrapura e quantificados (KO & AHN, 2007; STEINBUCH & AUDRAN, 1969).

2.2. Reagentes e Soluções

Todos os reagentes empregados foram de grau analítico, $K_4[Fe(CN)_6].3H_2O$ e H_2SO_4 foram obtidos da Merck (Alemanha). Solução tampão fosfato salino (PBS) 0,1 mol L^{-1} pH = 7,0, PBS 1X, solução tampão carbonato-bicarbonato pH = 9,6, $K_3[Fe(CN)_6]$, DHP, KCl, BSA, pirrol (Py), pirrol-ácido-3-carboxilico (Py3COOH), cisteamina, EDC, NHS, solução de glutaraldeído (50%), solução tween 20 e solução tween 80 foram adquiridos da Sigma-Aldrich (E.U.A). Álcool isopropílico foi comprado da Biotech (Brasil).

As soluções aquosas foram preparadas usando água purificada, obtida de um sistema de purificação Milli-Q Plus (Millipore, E.U.A) e em alguns casos foi empregada a solução de PBS 0,1 mol L^{-1} pH = 7,0. Uma balança analítica Shimadzu, modelo AUW220D (Filipinas) foi utilizada para pesar os reagentes sólidos.

2.3. Eletrodos Utilizados e Procedimentos de Limpeza

Para a fabricação dos imunossensores foram utilizados como suporte condutor os seguintes substratos:

Eletrodos de disco de ouro comerciais (AuDE) (2 mm em diâmetro). Os eletrodos foram usados como eletrodos de trabalho em uma célula eletroquímica convencional, com eletrodo de referência Ag/AgCl (KCl 3 mol L^{-1}) e contra eletrodo de platina. Eletrodos impressos de ouro (AuSPE) (220AT, Metrohm DropSens, Países Baixos), constituídos por eletrodo de trabalho de ouro (4 mm em diâmetro), contra eletrodo de ouro e pseudo-eletrodo de referência de prata.

A realização dos procedimentos de limpeza dos eletrodos baseou-se em reportes bibliográficos (DE MORAES, 2019; DI CARLO *et al.*, 2014; ITO *et al.*, 2020; ORELLANA CARLOS, 2017) e nas experiências do grupo de pesquisa do Laboratório de Bioeletrônica e Eletroanalítica do Departamento de Química da Universidade Federal do Amazonas e são descritos a seguir:

AuDE foram limpos mediante procedimento de limpeza mecânico e eletroquímico. A limpeza mecânica consistiu em polir os eletrodos com lixa de polimento (P4000), pano de polimento e alumina 0,3 e 0,05 µm, fornecidos pela Buehler (E.U.A) e levados a banho ultrassônico (Quimis, modelo Q335D, Brasil) em água deionizada durante três min. Em seguida, a limpeza eletroquímica foi realizada em H_2SO_4 (0,5 mol L^{-1}) através de 10 ciclos de CV na faixa de 0 - 1,5 V a 100 mV s^{-1}. Os eletrodos foram secos com gás nitrogênio (99,9% de pureza).

Os AuSPE foram cuidadosamente lavados com água deionizada e álcool isopropílico, seguido de limpeza eletroquímica em H_2SO_4 (0,5 mol L^{-1}) através de 10 ciclos de CV na faixa de 0 - 1,2 V, à 100 mVs^{-1}. Finalmente foram secos com gás nitrogênio (99,9% de pureza).

2.4. Equipamentos Utilizados

A caracterização estrutural por espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (do inglês *Fourier-Transform Infrared Spectroscopy*, FTIR) foi realizada no Instituto Federal do Amazonas-IFAM. Os espectros foram obtidos em um espectrômetro Agilent, modelo Cary 630 (E.U.A), acoplado com modulo de refletância total atenuada (do inglês *Attenuated Total Reflectance*, ATR), com cristal de diamante, operando no modo de transmissão, na faixa de varredura de 4000 a 600 cm^{-1}, sendo definido como número de varredura 150 e resolução 4 cm^{-1}. A medições usando espectroscopia Raman foram feitas no Instituto de Pesquisas Nucleares e Energéticas-IPEN/São Paulo, usando um espectrômetro MacroRam, da Horiba Scientific (Japão), com laser de 785 nm.

Os estudos morfológicos através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram realizados no Instituto de Pesquisa do Amazonas-INPA. Primeiramente, as amostras foram colocadas em suportes de alumínio com o auxílio de fita adesiva dupla face de carbono e levadas a um *Sputtercoater* (Balzers, modelo SCD 050, Suíça), onde foram recobertas com uma fina camada de ouro. Em seguida, as imagens foram analisadas em um microscópio Tescan, modelo Vega3 (França), com tensão do feixe de 30 kV. Além disso, a análise elemental da superfície dos eletrodos foi realizada por espectroscopia de energia dispersiva de raios X (do inglês *Energy-dispersive X-ray spectroscopy*, EDS), usando um detector Oxford, modelo AZtec 4.3 (Reino Unido) acoplado ao microscópio, sob aplicação de 30 kV a 5 mm de distância da amostra.

Os estudos morfológicos mediante microscopia de força atômica (do inglês *Atomic Force Microscopy*, AFM,) foram realizados no Instituto de Química da Universidade de São Paulo-USP, utilizando um microscópio Nanosurf, modelo Lens (Suíça), equipado com controlador c3000. Foi usado o modo contato e pontas comerciais: TAP 190, Al-G.

Os ensaios ELISA foram realizados no Instituto Leônidas e Maria Deane da Fundação Oswaldo Cruz (ILDM/ Fiocruz Manaus) e as medidas de densidade óptica (D.O) foram tomadas em espectrofotômetros da Molecular Devices, modelo FlexStation3 (E.U.A) e da Loccus, modelo LMR-96 (Brasil).

As medidas de ângulo de contato foram feitas usando um microscópio digital (Dino-Lite plus). Adicionou-se 1µL de água Milli-Q sobre a superfície dos AuDE limpos e modificados com cisteamina, e o comportamento da gota foi observado por um período de 120 segundos em temperatura de 22 ± 1 ºC. As medidas de ângulo de contato foram obtidas em triplicata com o auxílio do *software* Image J (domínio público).

As medidas eletroquímicas foram realizadas usando os potenciostatos: PGSTAT128N e PGSTAT204, ambos da Methrohm Autolab (Países Baixos), equipados com módulo de impedância eletroquímica e controlado pelo *software* Nova, versão 2.1.5. Todas as medidas foram realizadas em temperatura controlada (22 ± 1 ºC). Para o uso dos AuDE, foi usada uma célula eletroquímica convencional, preenchida com 5 mL da solução contendo a prova redox e imersos os três eletrodos (trabalho, referência e contra eletrodo). No caso dos AuSPE, 100 µL de solução foram gotejados para cobrir a área ocupada pelos três eletrodos impressos.

Os dados foram processados e representados em formato de gráfico, usando o *software* OriginPro, versão 9.1. Para obter uma maior confiabilidade dos dados, todas as medidas eletroquímicas foram realizadas em triplicata, sendo calculados os valores médios, desvio padrão e coeficiente de variação.

2.5. Fabricação dos Imunossensores Baseados em DHP

Para a fabricação dos imunossensores, o polímero DHP (1 mg mL^{-1}) foi preparado em solução de PBS, usando ação ultrassônica durante 2 h, até conseguir a dissolução do sólido e formação de uma suspensão de aparência turva (ARDILA *et al.*, 2014). A solução de DHP preparada foi misturada com anticorpos (Anti-*Pf*HRP2(IgG) e anticorpos previamente acoplados a NTC (Anti-*Pf*HRP2(IgG)-NTC) (GLORIA *et al.*, 2020; MARIUBA *et al.*, 2018).

As diferentes modificações realizadas sobre cada tipo de eletrodo aparecem representadas no esquema da Figura 2.1. Volumes de 3 e 5 µL de amostra foram depositados nos AuDE e AuSPE, respectivamente. Após evaporação do solvente, os eletrodos foram armazenados a 4 ºC durante 12h.

A caracterização eletroquímica do imunossensor AuDE/DHP/Anti-*Pf*HRP2(IgG) foi realizada em solução de $[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$ 5 mmol L^{-1} + KCl 0,1 mol L^{-1}, mediante as técnicas: CV a 50 mVs^{-1} na faixa de -0,2 a 0,7 V e EIS a 0,23 V na faixa de 100 kHz a 10 mHz, sendo realizadas 10 leituras por década logarítmica, com amplitude de

0,01 V_{RMS}. Caracterizações estruturais (FTIR) e morfológicas (MEV e AFM) também foram realizadas.

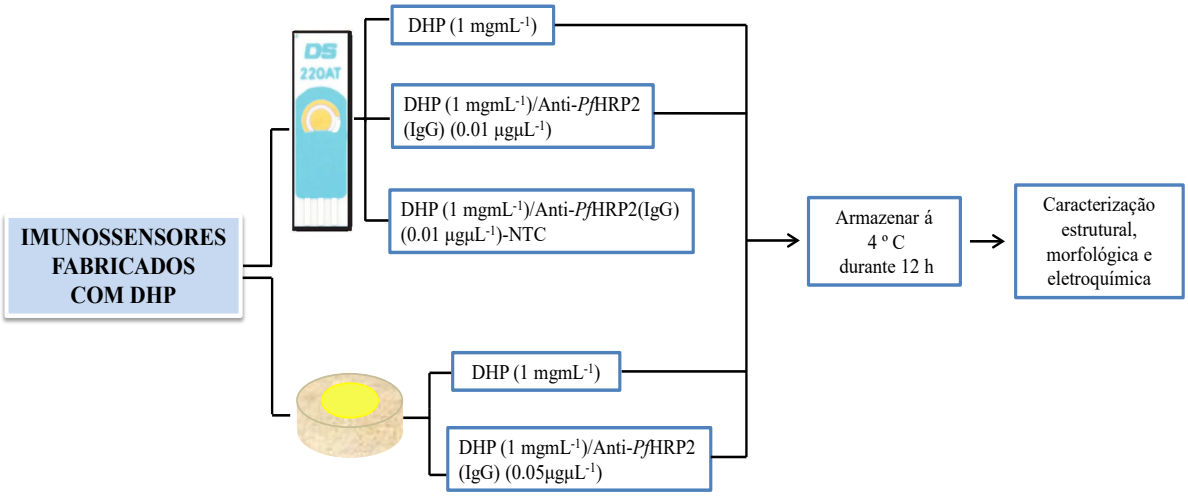

Figura 2.1 Diagrama do processo de fabricação dos imunossensores sobre substratos de ouro usando DHP como polímero de imobilização.

A caracterização eletroquímica do imunossensor AuSPE/DHP/Anti-*Pf*HRP2(IgG)-NTC realizou-se em solução de $[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$ 5 mmol L^{-1} + PBS 0,1 mol L^{-1}, através de DPV na faixa de -0,1 a 0,4 V a 25 mVs^{-1} e amplitude de 50 mV, e EIS a 0,12 V na faixa de 100 kHz a 100 mHz, 10 pontos por década, com amplitude de 0,01 V_{RMS}.

- **Otimização de Variáveis Analíticas e Detecção do Biomarcador Ag-*Pf*HRP2**

A influência das variáveis analíticas no desempenho do imunossensor AuDE/DHP/Anti-*Pf*HRP2(IgG) foi estudada (concentração do anticorpo na faixa de 0,01 - 0,07 µg $µL^{-1}$ e tempo de incubação na solução de antígeno, de 10 - 60 min). Nos ensaios foi usada uma solução padrão de *Pf*HRP2 (100 ng mL^{-1}) e as medidas realizadas através de DPV em solução de $[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$ 5 mmol L^{-1} + KCl 0,1 mol L^{-1}, aplicando potencial de - 0,1 a 0,7 V, a 25 mVs^{-1} e amplitude de 50 mV.

Com o objetivo de realizar uma curva padrão para relacionar o sinal de corrente e a concentração de Ag-*Pf*HRP2, várias concentrações do antígeno foram preparadas em solução de PBS (1 - 750 ng mL^{-1}). O imunossensor AuDE/DHP/Anti-*Pf*HRP2(IgG) foi incubado na solução durante 40 min e posteriormente lavados cuidadosamente com PBS e água ultrapura para eliminar o excesso de solução e moléculas não ligadas. Finalmente, duas etapas de detecção foram realizadas usando DPV (na faixa de -0,2 a 0,7 V, a 25 mV s^{-1} e

amplitude de 50 mV) e EIS (a 0,23 V, na faixa de 100 kHz a 10 mHz, sendo realizadas 10 leituras por década logarítmica, com amplitude de 0,01 V_{RMS}).

- **Ensaio ELISA**

Para a realização do ensaio ELISA, placas de microtitulação de 96 poços (SPL Life Sciences, Coreia do Sul) foram sensibilizadas com Anti-*Pf*HRP2(IgG) produzidos em camundongos (anticorpo de captura) (4 µg mL^{-1}), em solução tampão de carbonato-bicarbonato 50 mmol L^{-1}, pH = 9,6 (50 µL por poço) durante 16h a 4 °C em câmara úmida. Após este período, as placas foram lavadas com PBS 1X contendo solução tween 20 (0,05%) e bloqueadas com BSA (5%, em solução de PBS 1X) por 1h a 37 °C. Em seguida, a proteína recombinante *Pf*HRP2 foi adicionada em diferentes concentrações (1 - 125 ng mL^{-1}) e incubada durante 1h a 37 °C. A etapa posterior consistiu na adição dos anticorpos Anti-*Pf*HRP2(IgY) produzidos em galinhas (anticorpo primário) (0,25 µg por poço). Essas placas foram incubadas por 1h a 37 °C em câmara úmida, seguido por três lavagens com PBS 1X contendo solução tween 20 (0,01%). Em seguida, anticorpos Anti-galinha produzidos em cabra (tipo IgG) e conjugado com peroxidase de rábano (SeraCare KPL, E.U.A) foram usados como anticorpo secundário. Uma diluição 1/5000 foi usada e incubado novamente por 1h a 37 °C em câmara úmida. Após um novo ciclo de três lavagens, 50 µL do reagente TMB *One step* (Scienco, Brazil) foram adicionados à placa e incubados por 20 min em temperatura ambiente sem a presença de luz. A reação foi interrompida com 50 µL de H_2SO_4 (2 mol L^{-1}) e quantificada pela leitura da D.O a 450 nm.

- **Testes em Amostras Reais**

Os testes em amostras reais usando o imunossensor AuDE/DHP/Anti-*Pf*HRP2(IgG) foram realizados com soro humano negativo proveniente de um paciente saudável. O soro foi diluído 1:50 V/V e incrementado com várias concentrações de Ag-*Pf*HRP2 (10 - 500 ng mL^{-1}). O imunossensor foi incubado durante 40 min, lavado cuidadosamente com PBS e água ultrapura e realizada a medição usando DPV e EIS sob as mesmas condições experimentais descritas na detecção do antígeno. O ensaio ELISA também foi realizado com uma amostra negativa de soro incrementada com o antígeno em diferentes concentrações. Foi usado o mesmo procedimento experimental, descrito anteriormente para a detecção da proteína recombinante.

2.6. Fabricação do Imunossensor Usando Polímeros Condutores

Primeiramente, a superfície do eletrodo de trabalho de ouro do AuSPE foi recoberta com um filme polimérico. A solução monomérica empregada na eletropolimerização consistiu em uma mistura de Py (0,05 mol L^{-1}) e Py3COOH (0,1 mol L^{-1}) preparada em PBS 0,1 mol L^{-1} pH = 7,0 e purgada com N_2 durante 5 min. A eletropolimerização foi realizada através de CV na faixa de 0 a 1 V, durante 5 ciclos a 20 mV s^{-1}. Na seguinte etapa, com objetivo de ativar os grupos COOH presentes na superfície do copolímero, 8 µL de uma solução binaria de EDC (100 mmol L^{-1})/NHS (50 mmol L^{-1}) (1:1, V/V) foram depositados e mantidos durante 1 h em câmara úmida. A imobilização dos anticorpos foi realizada depositando 8 µL de Anti-*Pf*HP2(IgY) (0,2 µg μL^{-1}) e armazenados durante 4 h em câmara úmida a 4 ºC. Foi realizada uma etapa de bloqueio, depositando 8 µL de solução de BSA (1%) e incubados durante 1 h em câmara úmida. Após cada etapa de modificação descrita anteriormente, os eletrodos foram cuidadosamente lavados com água ultrapura e secos em temperatura ambiente.

As etapas de fabricação do imunossensor foram seguidas por EIS a 0,1 V, na faixa de 1000 Hz a 10 mHz, medindo 10 pontos por década, com amplitude de 0,01 V_{RMS}, em solução de $[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$ 5 mmol L^{-1} + KCl 0,1 mol L^{-1}. A caracterização estrutural do copolímero foi realizada por espectroscopia Raman e a análise elementar da superfície foi feita por EDS. Além disso, a morfologia do copolímero foi estudada por MEV.

- **Otimização de Variáveis Analíticas e Detecção do Biomarcador Ag-*Pf*HRP2**

Para obter um melhor desempenho do imunossensor, foi realizado um estudo de otimização do tempo de incubação em solução do anticorpo. Após a ativação dos grupos carboxílicos da superfície modificada com polímero, os eletrodos foram incubados em Anti-*Pf*HRP2(IgY) (0,2 µg μL^{-1}) durante 2, 3, 4 e 6h e medida a resposta eletroquímica por EIS sob os mesmos parâmetros experimentais usados na caracterização das etapas (descritos no parágrafo anterior).

Para a detecção do antígeno, o imunossensor AuSPE/P(Py-Py3COOH)/Anti-*Pf*HRP2(IgY)/BSA foi incubado durante 1 h em soluções de *Pf*HRP2 de diferentes concentrações (na faixa de 10 a 1000 ng mL^{-1}) preparadas em PBS 0,1 mol L^{-1} pH = 7,0. Em seguida, foi realizada uma etapa de lavagem com água Milli-Q para eliminar o excesso de solução e moléculas não ligadas. A resposta eletroquímica foi medida por EIS a 0,1 V, na faixa de 1000 Hz a 10 mHz, medindo10 pontos por década, com amplitude de 0,01 V_{RMS},

em solução de $[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$ 5 mmol L^{-1} + KCl 0,1 mol L^{-1}. Os dados foram representados em uma curva padrão, com objetivo de obter uma relação linear entre a resistência a transferência de carga e a concentração do antígeno.

- **Ensaio ELISA**

No ensaio ELISA, placas de microtitulação de 96 poços (SPL Life Sciences, Coreia do Sul) foram sensibilizadas com uma solução de anticorpos de galinha (Anti-*Pf*HRP2(IgY)) (4 µg mL^{-1}), diluídos em tampão carbonato-bicarbonato (50 mmol L^{-1} pH = 9,6) (50 µL por poço) por 2h a 37 °C em câmara úmida. Em seguida, as placas foram lavadas com PBS (10 mmol L^{-1}) contendo solução de tween 80 (0,1%). O bloqueio foi realizado durante 2 h a 37 °C com PBS (10 mmol L^{-1}) contendo solução de tween 80 (0,1%) e BSA (5%). Posteriormente, diferentes concentrações de proteína recombinante *Pf*HRP2 foram adicionadas (100 - 1000 ng mL^{-1}) e incubadas por 16h a 4 °C. Na seguinte etapa, adicionou-se anticorpos de camundongos (Anti-*Pf*HRP2(IgG)) (0,25 µg por poço) e as placas mantidas por 1h a 37 °C em câmara úmida, seguido de três lavagens com PBS contendo solução de tween 80 (0,1%). Em seguida, anticorpos biotinilados anti-camundongo, produzidos em cabra (Sigma Aldrich, E.U.A) foram adicionados na diluição 1/5000 e incubados novamente por 1h a 37 °C em câmara úmida, e a placa foi lavada como descrito anteriormente. Adicionou-se estreptavidina conjugada com peroxidase de rábano (SeraCare KPL, E.U.A) (diluição 1/5000) e mantido por 1h a 37 °C em câmara úmida. Após um novo ciclo de três lavagens, 50 µL do reagente TMB *One Step* (Scienco, Brasil) foram adicionados à placa e incubados por 10 min em temperatura ambiente na ausência de luz. A reação foi interrompida com 25 µL de H_2SO_4 (1 mol L^{-1}). O produto gerado foi quantificado pela leitura da D.O a 450 nm.

- **Estudo de Moléculas Interferentes**

Para comprovar a especificidade do imunossensor na determinação de *Pf*HRP2, foi realizado um estudo de possíveis moléculas interferentes usando várias soluções misturadas (*Pf*HRP2+ glicina, *Pf*HRP2+ glicose e *Pf*HRP2 + *Pv*LDH), com cada constituinte na concentração de 500 ng mL^{-1}. O imunossensor foi incubado durante 1h e medida a resposta eletroquímicas por EIS sob os mesmos parâmetros experimentais descritos na determinação de *Pf*HRP2.

2.7. Fabricação do Imunossensor Usando Monocamadas Automontadas

Primeiramente, para a formação das monocamadas, os AuDE limpos foram imersos em uma solução de cisteamina (50 mmol L^{-1}, preparada em etanol 99%) durante 4h a 25 °C. Em seguida, 3 µL de solução de glutaraldeído (2,5%) foram depositados sobre a superfície do eletrodo de ouro e mantidos em câmera úmida durante 1h. Para imobilização dos anticorpos, 3 µL de Anti-*Pv*LDH(IgY) (0,2 µg μL^{-1}) foram depositados no eletrodo e incubados em câmera úmida por 4h a 4 °C. Para evitar ligações inespecíficas do antígeno durante etapa de detecção, a superfície foi bloqueada com uma solução de BSA (1%) durante 1h em câmera úmida. Após cada etapa de modificação, o eletrodo foi cuidadosamente lavado com água Milli-Q e seco a temperatura ambiente. A caracterização eletroquímica das etapas de fabricação do imunossensor foi realizada por DPV na faixa de 0 a 0,45 V, a 25 mV s^{-1} em solução de $[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$ 5 mmol L^{-1} + KCl 0,1 mol L^{-1}.

- **Otimização de Variáveis Analíticas e Detecção do Biomarcador Ag-*Pv*LDH**

Para obter uma melhor formação das SAMs sobre a superfície do eletrodo foram testados diferentes tempos de incubação em solução de cisteamina (2, 3 e 4h) e medida a resposta eletroquímica por DPV sob os mesmos parâmetros eletroquímicos descritos na caracterização. Foi escolhida 50 mmol L^{-1} como concentração de cisteamina para a modificação, baseado em reportes bibliográficos onde o uso desta concentração mostrou bons resultados (RAMOS-JESUS *et al.*, 2011).

Com objetivo de obter uma curva de calibração e estabelecer uma relação linear entre corrente de pico anódico (I_{pa}) e concentração de *Pv*LDH, o imunossensor foi incubado em soluções de *Pv*LDH de diferentes concentrações (na faixa de 1 a 50 µg mL^{-1}) durante 1h em câmera úmida. Em seguida, os eletrodos foram lavados com água Milli-Q para remover as moléculas não ligadas e medida a resposta eletroquímica por DPV, na faixa de 0 a 0,45 V, a 25 mV s^{-1} em solução de $[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$ 5 mmol L^{-1} + KCl 0,1 mol L^{-1}

- **Estudo de Moléculas Interferentes**

O estudo de possíveis moléculas interferentes foi realizado por incubação do imunossensor em soluções binarias (*Pv*LDH + glicina, *Pv*LDH + glicose e *Pv*LDH + *Pf*HRP2) durante 1h, cada constituinte na concentração de 30 µg mL^{-1} e medida a resposta eletroquímica por DPV sob os mesmos parâmetros experimentais descritos no parágrafo anterior.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.

3.1. Caracterização dos Eletrodos de Ouro

As superfícies de AuDE e AuSPE foram analisadas por MEV e observadas as características morfológicas de ambos os eletrodos. A Figura 3.1 mostra as imagens do AuDE e AuSPE limpos nas ampliações de 833x e 8,33kx. No AuDE é possível observar uma superfície regular e homogênea com a incidência de pequenas porosidades (Figura 3.1 A e B). Os eletrodos de disco são lisos e polidos, o que corresponde com as características observadas e reportadas anteriormente em outros trabalhos (WANG & DU, 2002).

No caso do AuSPE (Figura 3.1 C e D), a superfície é heterogênea e irregular, observando a formação de grãos do metal de diferentes tamanhos. Além disso, ondulações e orifícios de maior tamanho são observados, atribuindo-lhe porosidade a superfície. Características similares foram reportadas por outros autores para eletrodos de ouro impressos (SAHA *et al.*, 2017; VERHEYEN *et al.*, 2011), podendo estar relacionadas ao processo de deposição de tinta do metal utilizada na fabricação deles.

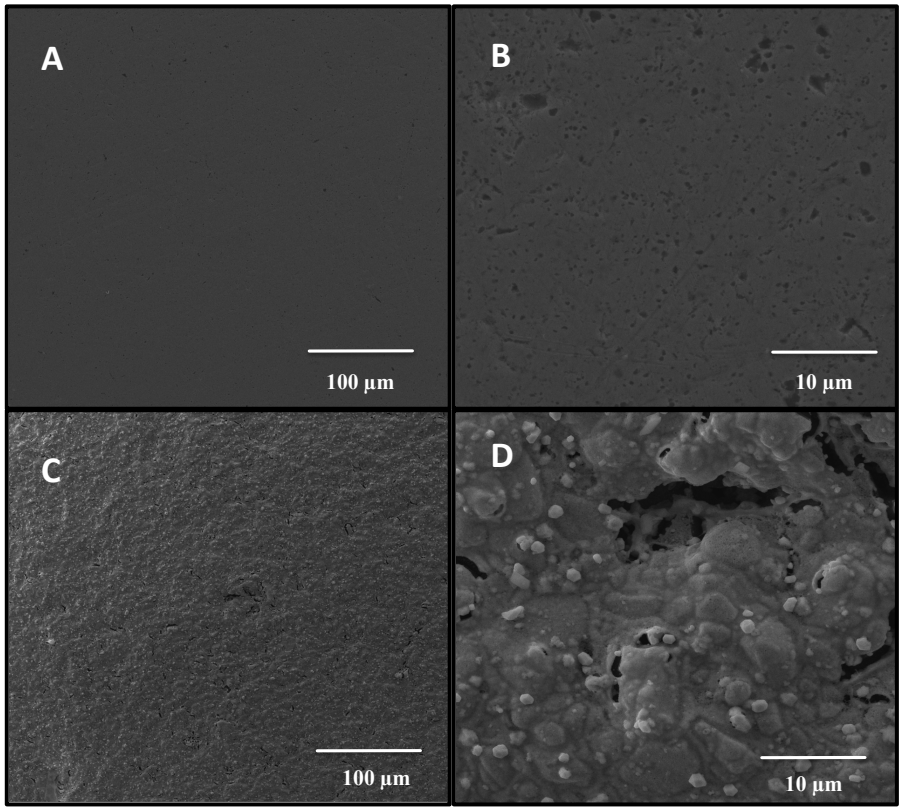

Figura 3.1. Imagens de MEV dos eletrodos de ouro em diferentes ampliações. A e B: AuDE e C e D: AuSPE.

A eficiência dos procedimentos de limpeza efetuado nos eletrodos AuDE e AuSPE foi estudada verificando o comportamento eletroquímico através da técnica de voltametria cíclica (Figura 3.2). Os valores obtidos para os parâmetros eletroquímicos (Ipa, Ipc e ΔEp) são mostrados na Tabela 3.1. No estudo foram testadas as seguintes soluções de eletrólitos:

i. Eletrólito A: solução de $[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$ 5 mmol L^{-1} + KCl 0,1 mol L^{-1};
ii. Eletrólito B: solução de $[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$ 5 mmol L^{-1} + PBS 0,1 mol L^{-1};
iii. Eletrólito C: solução de ($[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$ 5 mmol L^{-1} + KCl 0,1 mol L^{-1} + PBS 0,1 mol L^{-1}.

O perfil do AuDE sem limpeza (no eletrólito A) mostra um comportamento quase-reversível com um alto valor na diferença de potencial de pico (ΔEp = 254 mV). Por outro lado, no AuDE limpo é observada uma modificação no perfil voltamétrico com maior tendência à reversibilidade, onde os valores de corrente de pico (Ipa e Ipc) aumentaram, sendo a relação Ipa/Ipc = 1 e ΔEp diminuiu até 93 mV, evidenciando uma melhora nos processos de transferência de carga após os procedimentos de limpeza. No entanto, os perfis obtidos nos eletrólitos B e C mostraram voltamogramas mais largos, quando comparado com a resposta no eletrólito A, com maiores valores de ΔEp, correntes de pico mais baixas e relação Ipa/Ipc ≠ 1.

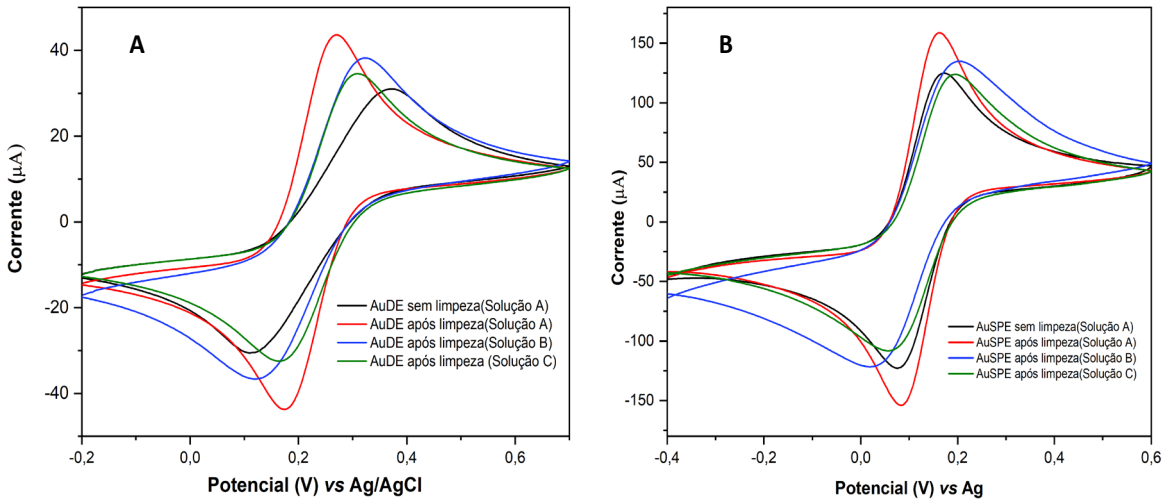

Figura 3.2. Comportamento eletroquímicos dos eletrodos de ouro. A: AuDE e B: AuSPE em diferentes soluções eletrolíticas.

No caso do AuSPE é observado um comportamento similar ao AuDE. Após o procedimento de limpeza eletroquímico as correntes de pico anódico e catódico do AuSPE

limpo no eletrólito A aumentaram, ΔEp = 77 mV e evidencia a melhor relação Ipa/Ipc, sendo mais próximo de um comportamento reversível. Cabe ressaltar que um pequeno deslocamento de potencial de pico (~ 0,1 V) é observado no AuSPE limpo quando comparado ao AuDE limpo, que pode estar relacionado ao uso de pseudo-eletrodo de referência de prata nos eletrodos impressos. Entretanto, o perfil do AuSPE limpo nos eletrólitos B e C apresentou menores valores de correntes de pico, maiores valores de ΔEp e relação Ipa/Ipc ≠ 1. Baseado nos resultados obtidos para ambos os eletrodos, foi escolhido o eletrólito A como solução mais apropriada para a realização das caracterizações eletroquímicas dos imunossensores fabricados sobre eletrodos de ouro.

Tabela 3.1. Parâmetros eletroquímicos obtidos na CV para os eletrodos AuDE e AuSPE usando diferentes soluções eletrolíticas.

Sistema	**AuDE**			**AuSPE**		
	Ipa (μA)	**Ipc (μA)**	**ΔEp (mV)**	**Ipa (μA)**	**Ipc (μA)**	**ΔEp (mV)**
Eletrodo sem limpeza (Eletrólito A)	29,06	-28,62	240	124,78	-122,69	94
Eletrodo limpo (Eletrólito A)	50,22	-50,12	93	164,62	-162,56	76
Eletrodo limpo (Eletrólito B)	38,87	-32,88	186	134,66	-115,81	163
Eletrodo limpo (Eletrólito C)	34,87	-31,77	134	123,14	-110,27	135

3.2. Imunossensores Baseados em DHP

3.2.1. Imunossensor AuDE/DHP/Anti-*Pf*HRP2(IgG)

As etapas do processo de fabricação e funcionamento do imunossensor baseado em DHP como matriz polimérica (AuDE/DHP/Anti-*Pf*HRP2(IgG)) é representado esquematicamente na Figura 3.3. A imobilização acontece mediante um método simples e direto, pela deposição de uma mistura polímero-anticorpo sobre a superfície dos eletrodos de ouro. Posteriormente é realizada a etapa de detecção do analito (Ag-*Pf*HRP2) e medida a resposta eletroquímica em $[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$ 5 mmol L^{-1} + KCl 0,1 mol L^{-1}.

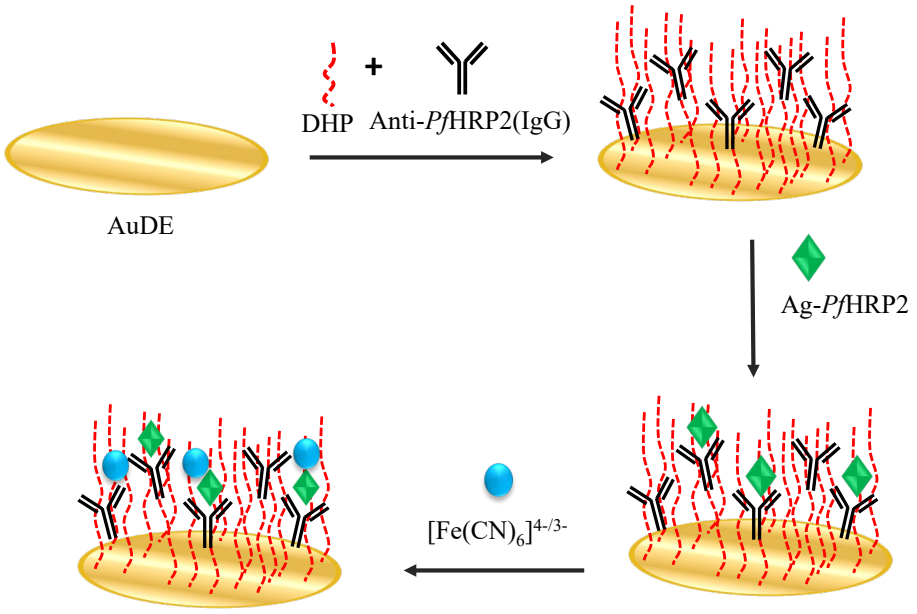

Figura 3.3. Representação esquemática das etapas de fabricação do imunossensor baseado em eletrodo modificado com DHP e procedimento analítico para determinação de Ag-*Pf*HRP2.

3.2.1.1. Caracterização Química

Para estudar os processos de imobilização dos anticorpos na superfície dos eletrodos foi utilizada a técnica espectroscópica FTIR-ATR. A Figura 3.4 mostra os espectros correspondentes ao ambiente químico de AuDE, AuDE/DHP e AuDE/DHP/Anti- *Pf*HRP2(IgG). Comparado com o eletrodo de ouro limpo, o AuDE/DHP apresenta vibrações em 2916 e 2847 cm^{-1}, características de estiramento de C-H, e vibrações de dobramento de C-H aparecem em 1342 cm^{-1}, correspondentes às cadeias alifáticas do DHP. Vibrações em 2384 e 1648 cm^{-1} foram observados e atribuídas ao grupo fosfato (vibrações de estiramento e dobramento de P-O-H, respectivamente). A banda vibracional em 1066 cm^{-1} corresponde às vibrações de estiramento P-O-C (ARIGA *et al.*, 2002; MIELOCH *et al.*, 2018).

Entretanto, no espectro de AuDE/DHP/Anti-*Pf*HRP2(IgG) é possível observar bandas vibracionais associadas aos grupos moleculares presentes nos anticorpos imobilizados no eletrodo. Bandas características de vibrações de estiramento das ligações O-H e N-H aparecem entre 3200 e 3400 cm^{-1}. Por outro lado, a intensidade do sinal em 1648 e 1066 cm^{-1} aumenta, evidenciando as funções C=O e C-O, características dos aminoácidos presentes nas proteínas (MOREIRA *et al.*, 2016).

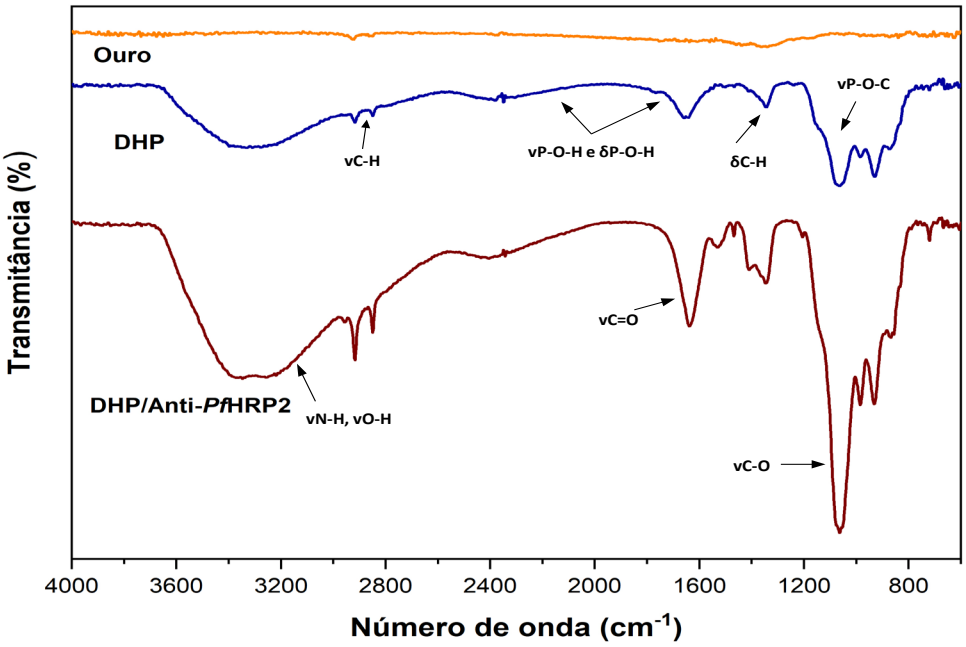

Figura 3.4. Espectros FTIR-ATR da superfície do eletrodo de ouro (AuDE), AuDE modificado com DHP e AuDE modificado com DHP/Anti-*Pf*HRP2(IgG).

3.2.1.2. Caracterização Morfológica

Na Figura 3.5 são apresentadas imagens de MEV do processo de modificação do eletrodo de ouro. De acordo com a figura, o eletrodo de ouro limpo mostra uma superfície regular e continua (Figura 3.5 A). Depois de realizado o processo de deposição, alterações nas imagens de MEV são observadas; o eletrodo modificado com DHP mostra estruturas granulares, formando aglomerados, produto da deposição do polímero (Figura 3.5 B).

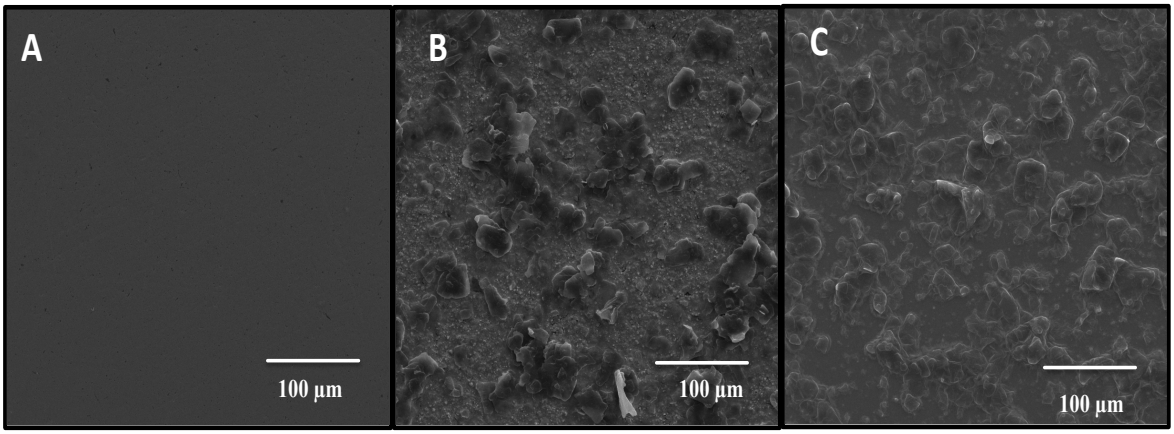

Figura 3.5. Imagens de MEV do eletrodo de ouro limpo e modificado. A: AuDE limpo, B: AuDE/DHP e C: AuDE/DHP/Anti-*Pf*HRP2(IgG).

A imagem da superfície modificada com DHP/Anti-*Pf*HRP2(IgG) evidencia uma densificação caracterizada pela contribuição das estruturas das proteínas presentes na amostra (Figura 3.5 C). Outros autores reportaram características similares ao funcionalizar superfícies de carbono com anticorpos (PARKASH *et al.*, 2014).

Imagens de AFM mostram as diferenças topográficas da superfície durante as etapas de fabricação do imunossensor (Figura 3.6). O filme funcionalizado com o polímero DHP (Figura 3.6 A) apresenta formação de aglomerados, distribuídos geralmente de forma homogênea, sendo a rugosidade média superficial de 24,76 nm. No entanto, no filme contendo DHP/Anti-*Pf*HRP2(IgG) (Figura 3.6 B) nota-se o aumento na irregularidade e nos aglomerados, com rugosidade média superficial de 44,39 nm, aumento que pode ser explicado pela presença dos anticorpos imobilizados, que são estruturas globulares de grande tamanho (aproximadamente 150 kDa). As diferenças mostradas nos resultados obtidos por AFM estão em correspondência com os resultados obtidos por MEV.

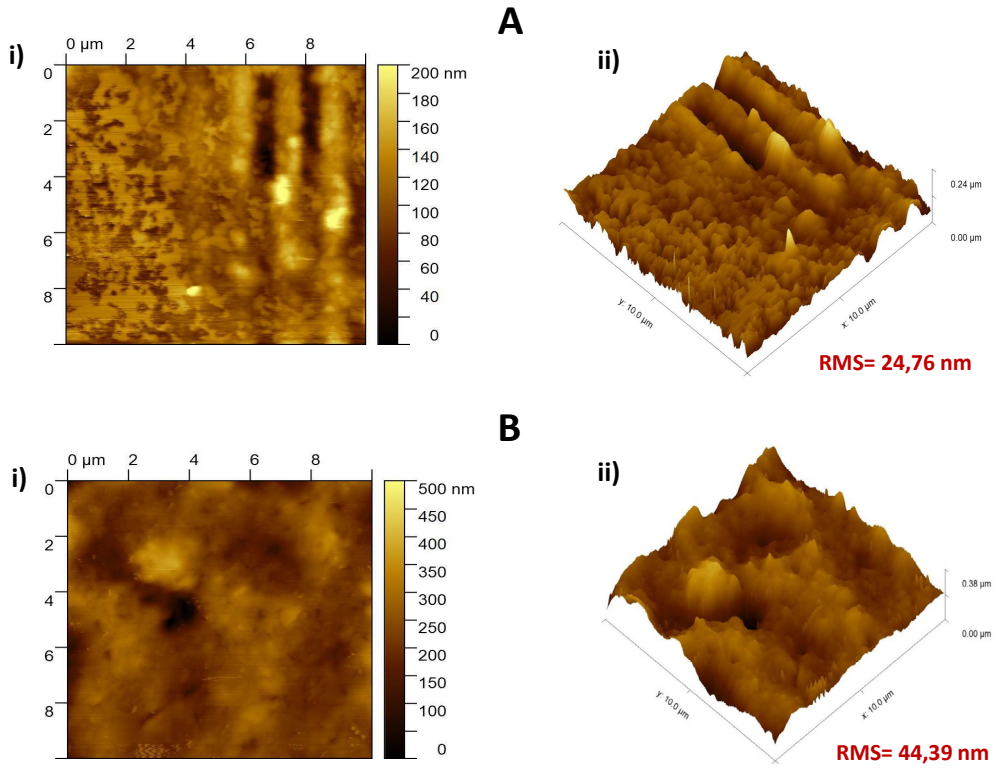

Figura 3.6. Imagens de AMF (i): bidimensional e ii): tridimensional) da superfície dos eletrodos modificados. A: AuDE/DHP e B: AuDE/DHP/Anti-*Pf*HRP2(IgG).

3.2.1.3.Caracterização Eletroquímica

CV e EIS foram utilizadas como técnicas eletroanalíticas na caracterização das diferentes etapas de fabricação do imunossensor. A CV de uma espécie eletroativa solúvel com comportamento químico rápido e reversível, constitui uma ferramenta valiosa para monitorar os estágios de modificação das superfícies dos eletrodos. Na Figura 3.7 A, o eletrodo AuDE limpo mostra uma resposta quase-reversível e bem definida para o $[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$, com altos valores nas correntes de pico anódico e catódico (Tabela 3.2) confirmando que a transferência de elétrons é controlada pelo transporte de massa no eletrodo limpo.

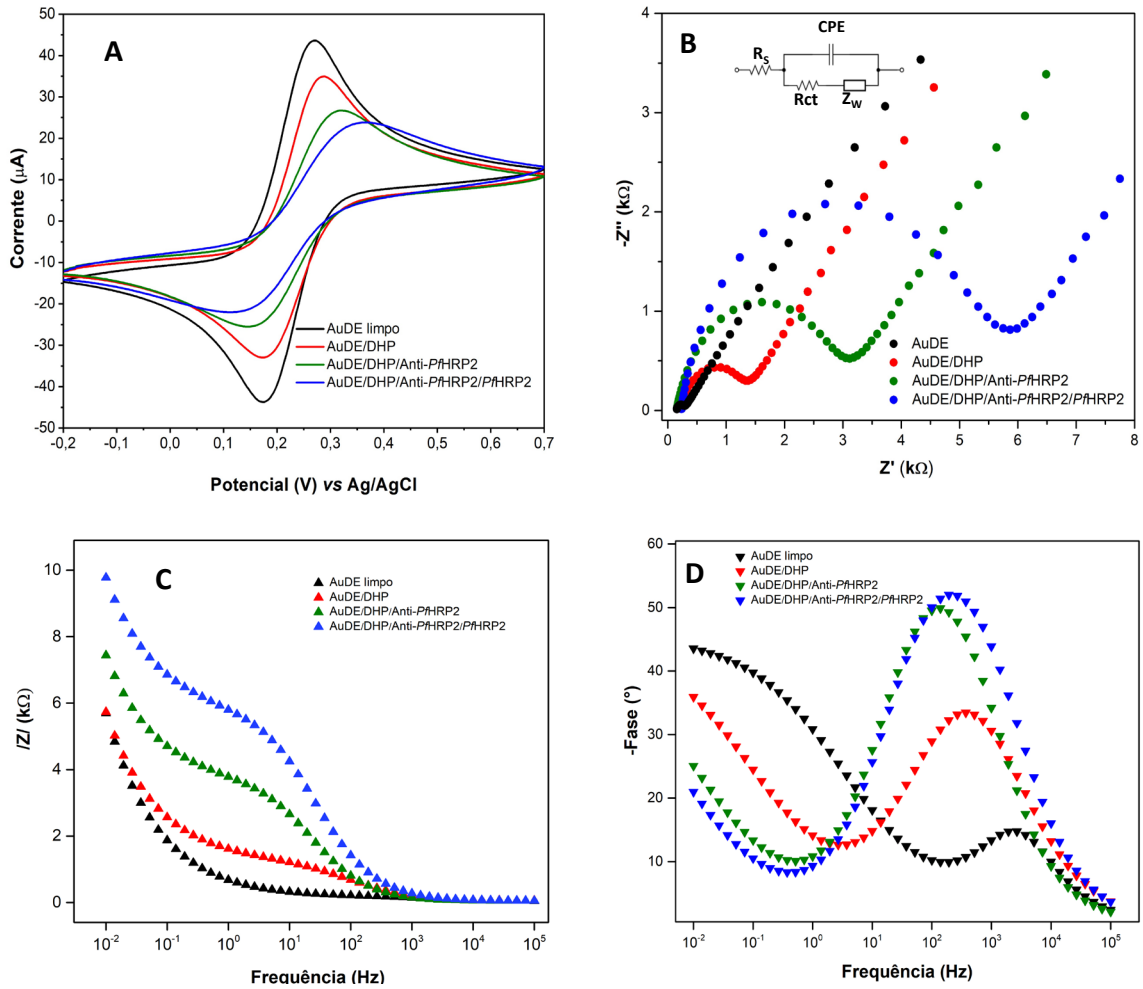

Figura 3.7. A: Voltamogramas cíclicos, B: Diagramas de Nyquist e C e D: Diagramas de Bode das diferentes etapas de modificação dos AuDE em solução de $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ (5 mmol L^{-1}) + KCl (0,1 mol L^{-1}).

Por outro lado, a capacidade da sonda redox ($[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$) de acessar a superfície do eletrodo diminui para o eletrodo AuDE/DHP, porque o DHP é um composto

carregado negativamente, que impede a difusão dos íons que compõem a sonda redox em direção à superfície do eletrodo devido à exclusão de cargas (WU & HU, 2005). O perfil voltamétrico obtido com os eletrodos modificados com biomoléculas (AuDE/DHP/Anti-*Pf*HRP2(IgG) e AuDE/DHP/Anti-*Pf*HRP2(IgG)/Ag-*Pf*HRP2) mostraram uma tendência semelhante (diminuição nos valores de corrente) e voltamogramas mais amplos, com maior separação de pico anódico-catódico, alcançando até 246 mV depois da ligação Ac-Ag (Tabela 3.2), o qual indica que a transferência de elétrons é parcialmente bloqueada devido às características isolantes dessas estruturas biológicas. A diferença entre os dois últimos sistemas evidencia que a ligação com o analito acontece, levando a uma maior passivação do eletrodo quando o antígeno é detectado.

Os resultados dos experimentos realizados por EIS são mostrados na Figura 3.7 B - D, sendo os dados representados como gráficos de Nyquist (Impedância imaginaria (- Z'') *vs* impedância real (Z')) e gráficos de Bode (|Z| *vs* logaritmo da frequência e fase *vs* logaritmo da frequência). O espectro de impedância inclui um semicírculo em frequências mais altas que representa a resistência de transferência de elétrons, evidenciando o comportamento de bloqueio da superfície do eletrodo nua/modificada em direção à sonda redox, e uma parte linear em frequências mais baixas que representa o processo de difusão (RANDVIIR & BANKS, 2013).

Tabela 3.2. Parâmetros eletroquímicos obtidos na CV para as diferentes etapas de modificação dos eletrodos AuDE.

Sistema	**Ipa (µA)**	**Ipc (µA)**	**ΔEp (mV)**
AuDE limpo	50,22	-50,12	93
AuDE/DHP	40,94	-36,13	114
AuDE/DHP/Anti-*Pf*HRP2(IgG)	30,11	-28,25	172
AuDE/DHP/Anti-*Pf*HRP2(IgG)/Ag-*Pf*HRP2	26,11	27,69	246

Os valores de resistência a transferência de carga (Rct) fornecem as informações analíticas e foram avaliados por ajuste (*software* NOVA 2.1.5) dos dados experimentais para o circuito equivalente de Randles (inserido na Figura 3.7 B), onde Rs é a resistência da solução, os contatos externos e as conexões; Zw é a impedância descrita por Warburg, que corresponde à impedância causada pela transferência de massa das espécies redox ao eletrodo; e CPE é o elemento de fase constante, associado a formação da dupla camada elétrica na interface eletrodo/solução (GROSSI & RICCÒ, 2017; RANDVIIR & BANKS,

2013). Idealmente, o Zw e Rs representam as propriedades da solução eletrolítica e difusão da prova redox e não são afetados significativamente pelas modificações feitas na superfície do eletrodo. Portanto, os parâmetros capacitância e Rct são os principalmente usados em sensores impedimétricos (TRUONG *et al.*, 2011). Neste caso usaremos Rct para determinar as propriedades interfaciais dos eletrodos usando o par redox $[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$ na solução.

O gráfico mostra que os valores mais baixos de resistência de transferência de elétrons foram obtidos com o eletrodo de ouro limpo (Rct = 136 Ω) (Figura 3.7 B). Na modificação seguinte, o semicírculo aumentou consideravelmente (Rct = 1,21 kΩ) indicando a presença da camada isolante resultante do processo de deposição do polímero DHP. Este comportamento foi relatado por outros autores para eletrodos de ouro e carbono vítreo modificados com DHP e foi atribuído ao bloqueio parcial da transferência de elétrons (IBÁÑEZ-REDÍN *et al.*, 2018; WU & HU, 2005). Posteriormente, com a presença de Anti-*Pf*HRP2(IgG) na amostra, o comportamento isolante da superfície do ouro aumentou e levou a um aumento na curva do semicírculo (Rct = 2,82 kΩ), confirmando a imobilização bem-sucedida dos anticorpos (TUBÍA *et al.*, 2018).

Por último, houve um aumento significativo nos valores de resistência (Rct = 5,29 kΩ) após a fixação dos antígenos (Ag-*Pf*HRP2, 100 ng mL^{-1}) aos anticorpos imobilizados, formando o complexo Ac-Ag. Através dos gráficos de Bode (Figura 3.7 C e D) foi possível visualizar as frequências onde são registrados os diferentes processos, tanto no eletrodo limpo quanto o eletrodo modificado. Foi evidenciado que à medida que a superfície é modificada com compostos de características isolantes, os valores de |Z| e angulo de fase aumentam.

O comportamento de transferência de elétrons do par redox $[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$ no eletrodo limpo e no imunossensor AuDE/DHP/Anti-*Pf*HRP2(IgG) foi investigado pela realização de experimentos de CV a diferentes taxas de varredura, variando de 10 a 200 mV s^{-1}, na faixa potencial de -0,2 a 0,7 V. Os voltamogramas do imunossensor (Figura 3.8 A) registraram maiores valores de Ipa, Ipc e ΔEp à medida que aumenta a velocidade de varredura, o qual é uma característica de sistemas quase-reversíveis. Em ambos os sistemas (eletrodo limpo e modificado), os valores de Ipa e Ipc aumentaram linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varredura (Figura 3.8 B), sugerindo que na reação eletroquímica, o transporte de massa que ocorre do interior da solução até a superfície do eletrodo é um processo controlado por difusão (BARD & FAULKNER, 2005). Nota-se que os valores de

Ipa e Ipc para o imunossensor diminuem em todas as velocidades de varredura, quando comparado com o eletrodo limpo, adquirindo características isolantes, produto da modificação realizada.

As equações de regressão para ambos os sistemas são as seguintes:

AuDE limpo: $\mathrm{I_{pa}}(\mu\mathrm{A}) = 5{,}916\mathrm{v}^{\frac{1}{2}}(\mathrm{mV}s^{-1}) - 0{,}841 \qquad (R^2 = 0{,}998)$

$$\mathrm{I_{pc}}(\mu\mathrm{A}) = -5{,}614\mathrm{v}^{\frac{1}{2}}(\mathrm{mV}s^{-1}) - 0{,}446 \quad (R^2 = 0{,}999)$$

AuDE/DHP/Anti-*Pf*HRP2(IgG): $\mathrm{I_{pa}}(\mu\mathrm{A}) = 4{,}255\mathrm{v}^{\frac{1}{2}}(\mathrm{mV}s^{-1}) + 1{,}496 \qquad (R^2 = 0{,}992)$

$$\mathrm{I_{pc}}(\mu\mathrm{A}) = -3{,}183\mathrm{v}^{\frac{1}{2}}(\mathrm{mV}s^{-1}) - 6{,}053 \quad (R^2 = 0{,}995)$$

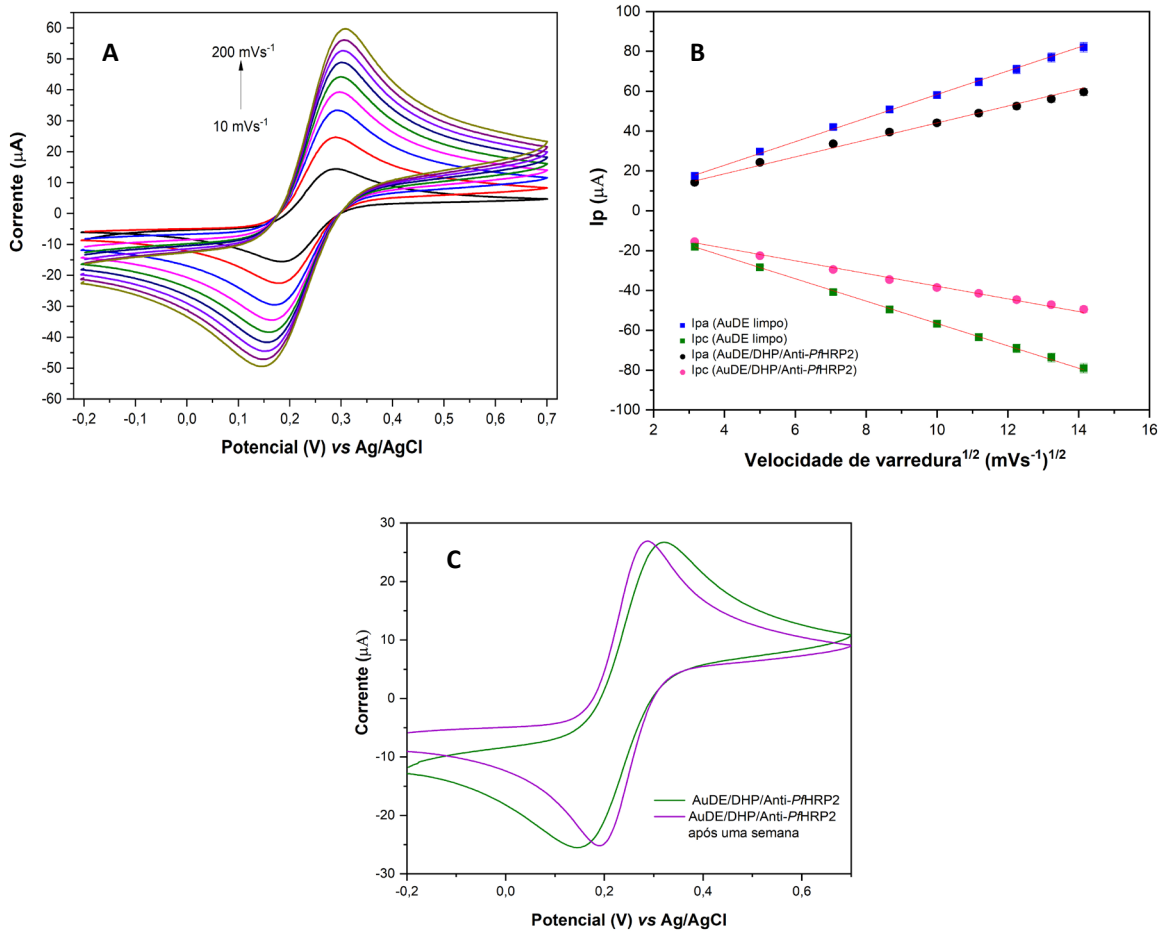

Figura 3.8. A: Voltamogramas cíclicos do imunossensor AuDE/DHP/Anti-*Pf*HRP2(IgG), obtidos a diferentes velocidades de varredura (10, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200 mV s^{-1}) em solução de $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ (5 mmol L^{-1}) + KCl (0,1 mol L^{-1}). B: Corrente de pico *vs* raiz quadrada da velocidade de varredura, e C: Voltamogramas do imunossensor antes e após uma semana de armazenamento a 4 °C.

Para testar a estabilidade do imunossensor foi coletada a resposta eletroquímica usando CV após os eletrodos serem armazenados durante uma semana a 4 °C (Figura 3.8 C). Os resultados mostraram um perfil voltamétrico semelhante em ambos os voltamogramas (antes e depois do armazenamento), com uma pequena modificação nos potenciais de pico e sem variação significativa nas correntes de pico (Ipa e Ipc), indicando boa estabilidade.

Devido o perfil voltamétrico deste imunossensor ser mais parecido com sistemas reversíveis, utilizamos a equação de Randles-SecVik (Eq.1) para calcular a área eletroativa do eletrodo a 50 mVs^{-1}, onde foram obtidos para AuDE limpo e AuDE/DHP/Anti-*Pf*HRP2(IgG) valores de 0,0538 ± 0,0001 cm^2 e 0,0429 ± 0,0001 cm^2, respectivamente. A modificação feita no eletrodo provoca uma diminuição aproximadamente de 20,2% da área eletroativa.

$$I_p = 2{,}69 \times 10^5 \times n^{\frac{3}{2}} \times A \times C \times D^{\frac{1}{2}} \times v^{\frac{1}{2}} \qquad \text{(Eq.1)}$$

Onde:

Ip: corrente de pico (A);

A: área eletroativa do eletrodo (cm^2);

D: coeficiente de difusão da espécie eletroativa para a solução de $[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$ é igual a $6{,}7 \times 10^{-6} cm^2 s^{-1}$;

n: número de elétrons transferidos na reação redox;

v: velocidade de varredura (Vs^{-1});

C: concentração da espécie eletroativa (mol L^{-1}).

3.2.1.4. Otimização das Variáveis Analíticas

A otimização de parâmetros analíticos constitui uma etapa importante no desenvolvimento do imunossensor, pois as diferentes variáveis experimentais podem influenciar no desempenho do dispositivo. Com o objetivo de obter as melhores respostas eletroquímicas quando o antígeno é detectado, neste trabalho foi investigada a influência da concentração do anticorpo imobilizado (Anti-*Pf*HRP2(IgG)) e o tempo de incubação em solução de Ag-*Pf*HRP2.

As respostas eletroquímicas obtidas nesse estudo são apresentadas na Figura 3.9 A, onde foram analisadas várias concentrações na faixa de 0,01 - 0,07 μg μL^{-1}. O gráfico evidencia que acontece uma diminuição nos valores de corrente de pico anódico com o aumento da concentração até 0,05 μg μL^{-1}. A maiores concentrações não foram registradas

diminuições da corrente. Portanto, foi escolhida 0,05 μg μL^{-1} como concentração ótima para imobilizar os anticorpos na superfície dos eletrodos.

O tempo de incubação em solução de Ag-*Pf*HRP2 também foi otimizado no intervalo de 10 - 60 min (Figura 3.9 B). Uma diminuição contínua nos valores de corrente de pico anódico foi registrada até 40 min de incubação. Em intervalos maiores de tempo as mudanças no sinal não são consideráveis. Portanto, o tempo de 40 min se mostrou como tempo adequado para a ligação antígeno-anticorpo.

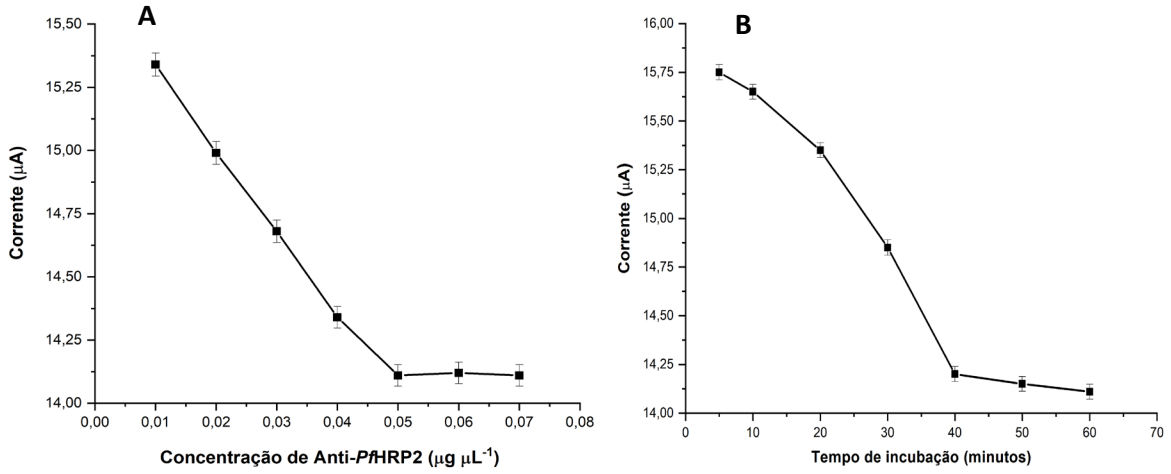

Figura 3.9. Otimização de A: Concentração de Anti-*Pf*HRP2(IgG) usada na imobilização e B: Tempo de incubação em solução de Ag-*Pf*HRP2.

Outros parâmetros como pH ótimo para os ensaios analíticos e concentração do polímero (DHP) foram reportados por outros autores, que desenvolveram um biossensor baseado na funcionalização de eletrodos de carbono vítreo com NTC e DHP para a detecção de bezafibrato (ARDILA *et al.*, 2014). Boas respostas eletroquímicas foram obtidas no nosso trabalho com o uso desses parâmetros, fato pelo qual não foi feita nenhuma alteração experimental ao respeito.

3.2.1.5. Determinação Analítica de Ag-*Pf*HRP2 e Testes em Amostras Reais

O desempenho analítico do imunossensor foi estudado através de ensaios de detecção do antígeno em soluções padrões de Ag-*Pf*HRP2 em várias concentrações (1, 10, 100, 200, 300, 400, 500 e 750 ng mL^{-1}, preparadas em PBS 0,1 mol L^{-1}, pH = 7), mediante duas técnicas eletroquímicas (EIS e DPV). Os resultados para EIS são mostrados na Figura 3.10 A, onde as alterações no espectro evidenciam maiores semicírculos com o aumento da

concentração de Ag-*Pf*HRP2, e um comportamento linear desse aumento é observado na faixa de concentração de 10 - 400 ng mL^{-1}.

Este comportamento pode ser explicado devido as maiores interações Ac-Ag acontecerem na superfície do eletrodo com o aumento da concentração do antígeno, fazendo com que a passagem de corrente seja dificultada e evidenciando maiores valores na resistência calculada (usando o circuito equivalente Randles, inserido da Figura 3.7 B). A curva de calibração foi obtida em um gráfico de resistência (R) (kΩ) *vs* concentração do Ag-*Pf*HRP2 (ng mL^{-1}). A equação da reta foi definida como $\mathrm{R(k\Omega)} = 0{,}023[Pf\mathrm{HRP2}] + 3{,}25$ ($\mathrm{R}^2 = 0{,}994$) (Figura 3.10 B). O coeficiente de variação para determinação de 100 ng mL^{-1} Ag-*Pf*HRP2 foi de 4,95% (n = 3).

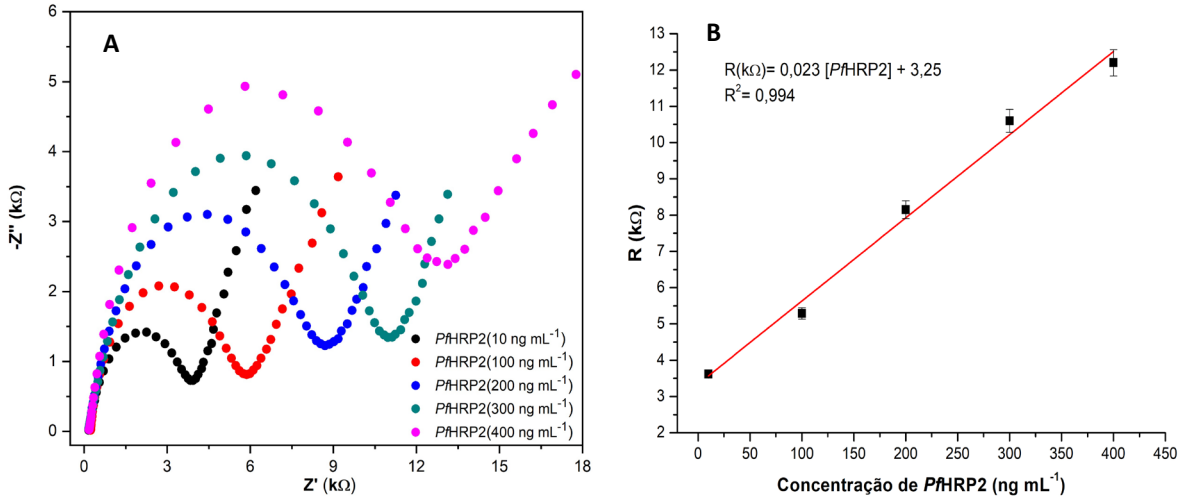

Figura 3.10. Resposta do imunossensor após incubação em diferentes concentrações de Ag-*Pf*HRP2 em solução de $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ (5 mmol L^{-1}) + KCl (0,1 mol L^{-1}). A: Diagramas de Nyquist, B: Curva de calibração (resistência *vs* concentração de Ag-*Pf*HRP2).

Experimentos semelhantes foram repetidos usando DPV (Figura 3.11 A), e uma relação linear foi observada na faixa de concentração de 10 - 500 ng mL^{-1} de Ag-*Pf*HRP2. Com o aumento da concentração de antígeno, observa-se uma diminuição nos valores de Ipa nos voltamogramas, produzida pelo aumento de passivação do eletrodo quando o imunossensor é exposto a maiores concentrações de antígeno. A curva de calibração foi obtida em um gráfico de corrente de pico anódico (μA) *vs* concentração de Ag-*Pf*HRP2 (ng mL^{-1}). A equação da reta foi definida por $\mathrm{I_{pa}(\mu A)} = -0{,}018[Pf\mathrm{HRP2}] +$

15,82 ($R^2 = 0,991$) (Figura 3.11 B). O coeficiente de variação para a determinação de 100 ng mL^{-1} de Ag-*Pf*HRP2 foi de 4,88% (n = 3).

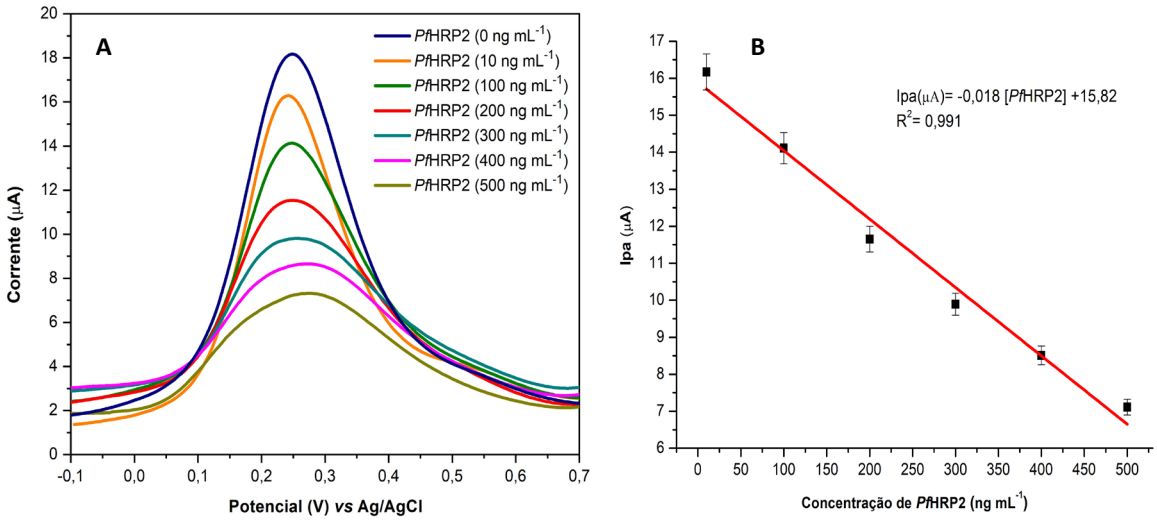

Figura 3.11. Resposta do imunossensor após incubação em diferentes concentrações de Ag-*Pf*HRP2 em solução de $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ (5 mmol L^{-1}) + KCl (0,1 mol L^{-1}). A: Voltamogramas de DPV, B: Curva de calibração (corrente *vs* concentração de Ag-*Pf*HRP2).

Estudos de ELISA foram realizados e a curva analítica foi obtida através da relação entre a D.O e a concentração de Ag-*Pf*HRP2 (ng mL^{-1}). Os resultados mostraram uma relação linear na faixa de concentração de 15 - 125 ng mL^{-1} de Ag-*Pf*HRP2. A equação da reta foi definida por $D.O = 0,01[PfHRP2] + 0,24$ ($R^2 = 0,993$) (Figura 3.12 A). O coeficiente de variação para a determinação de 100 ng mL^{-1} de Ag-*Pf*HRP2 foi de 5,44% (n = 3).

Com o objetivo de validar os métodos de detecção eletroquímica usados, os resultados entre o ELISA e a EIS foram correlacionados, e comparadas as respostas frente a concentrações de Ag-*Pf*HRP2, na faixa de 20 a 120 ng mL^{-1}. Encontrou-se um comportamento linear com inclinação de 1,008, indicando boa correspondência entre o ELISA e o imunossensor eletroquímico (Figura 3.12 B).

O LD foi calculado para cada método, de acordo com as recomendações da IUPAC, onde $LD = \frac{3DP}{m}$, sendo DP: desvio-padrão da medida do branco e m: coeficiente angular da curva analítica (CURRIE, 1999). O LD foi de 3,3 ng mL^{-1} e 2,8 ng mL^{-1} para EIS e DPV, respectivamente. Enquanto o LD para o teste ELISA foi de 5,5 ng mL^{-1}. O tempo total do ensaio para a determinação de Ag-*Pf*HRP2 pelos métodos eletroquímicos foi de

45 min, o qual é muito menor comparado ao tempo normalmente necessário para o teste ELISA convencional (180 min) (JANG *et al.*, 2018).

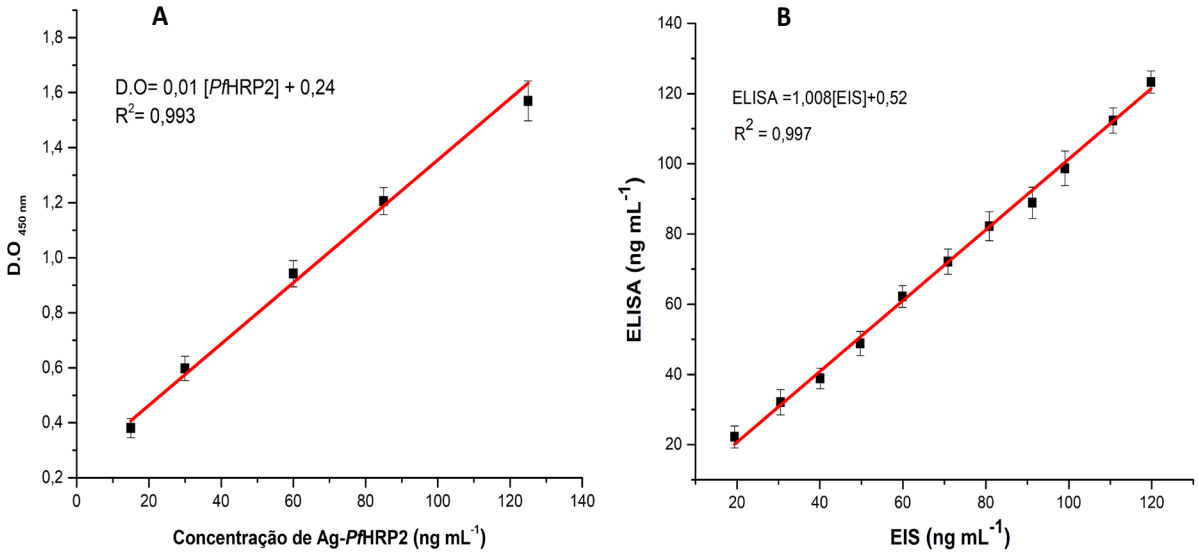

Figura 3.12. A: Curva de calibração do ELISA e B: Correlação entre o ELISA e a detecção do imunossensor por EIS.

Para avaliar a aplicabilidade analítica do imunossensor eletroquímico, a quantidade de antígeno foi quantificada pelas técnicas DPV e EIS usando amostras negativas de soro humano incrementadas com Ag-*Pf*HRP2. Foi observada uma boa correlação nos resultados das amostras com adição de Ag-*Pf*HRP2 (Tabela 3.3). Portanto, o imunossensor desenvolvido pode ser considerado seletivo em relação às interferências presentes nas amostras de soro.

Tabela 3.3. Comparação das diferentes concentrações de Ag-*Pf*HRP2 detectadas em amostras de soro humano por EIS e DPV usando o imunossensor e o teste ELISA (média de três determinações ± Desvio padrão).

Amostras[a]	EIS[b]	DPV[c]	ELISA
0	0,01±0,01	0,01±0,01	0,02±0,02
10	10,1 ± 0,05	10,2 ± 0,06	9,5±0,4
50	50,3 ± 0,1	49.9 ± 0,2	51,9±0,3
100	99,8 ± 0,5	99,8 ± 0,6	102,5±0,6
200	201,1 ± 1,1	199,8 ± 1,2	197,6±1,5
300	302,2 ± 1,3	301,3 ± 1,4	303,2±1,8
400	399,1 ± 2,1	402,8 ± 2,1	403,5±2,5

[a]Amostras de soro humano +Ag-*Pf*HRP2 (ng mL^{-1}), [b]espectroscopia de impedância eletroquímica e [c]voltametria de pulso diferencial.

Os níveis de concentração de Ag-*Pf*HRP2 detectados usando o imunossensor eletroquímico são altos e estão associados à malária não severa e severa. Valores maiores a 100 ng mL^{-1} deste biomarcador têm sido considerados por outros autores como malária severa. (CASTRO-SESQUEN *et al.*, 2016; HENDRIKSEN *et al.*, 2013).

3.2.2. Imunossensor AuSPE/DHP/Anti-*Pf*HRP2(IgG)-NTC

Com o objetivo de melhorar o desempenho eletroquímico do imunossensor usando DHP, foram usadas amostras de anticorpos Anti-*Pf*HRP2(IgG) acoplados à NTC. O processo de acoplamento e caracterização foi reportado por Gloria e colaboradores (2020) e desenvolvido no Instituto Leônidas e Maria Deane/FioCruz-Manaus em colaboração com nosso grupo de pesquisa. O processo de modificação dos eletrodos impressos de ouro é representado a seguir (Figura 3.13).

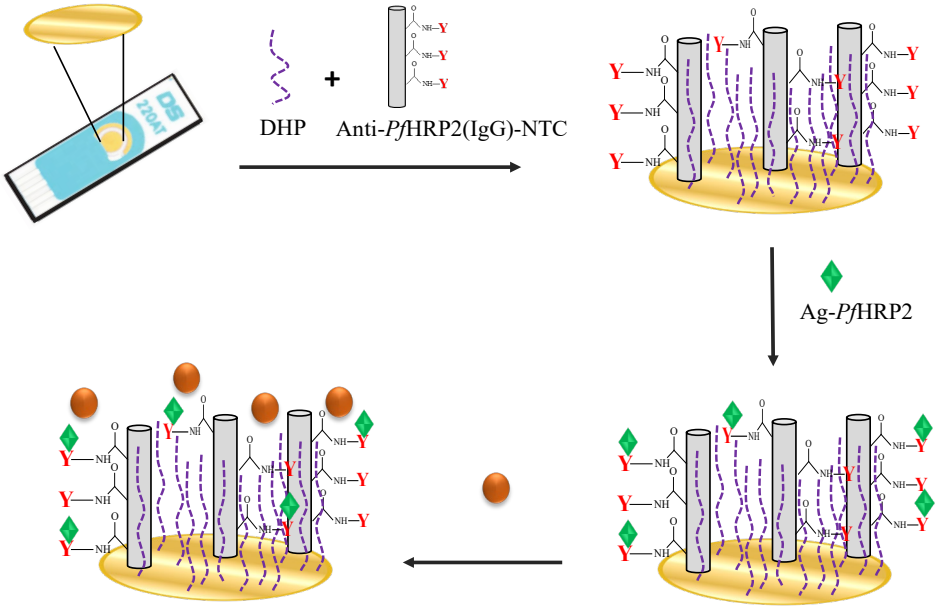

Figura 3.13. Representação esquemática das etapas de fabricação do imunossensor baseado em eletrodo modificado com DHP e NTC e procedimento analítico para determinação de Ag-*Pf*HRP2.

Experimentos de DPV e EIS foram realizados para analisar as características eletroquímicas dos eletrodos modificados com DHP/Anti-*Pf*HRP2(IgG)-NTC (Figura 3.14). Os resultados mostraram mudanças no perfil voltamétrico dos eletrodos modificados em comparação com o AuSPE sem modificação, no qual apresenta valores mais alto para Ipa e menores valores de Rct (223 Ω) (Tabela 3.4). Os valores de Rct foram calculados usando o circuito equivalente inserido na Figura 3.7 B. O eletrodo modificado com DHP/Anti-

*Pf*HRP2(IgG) (ausência de NTC) apresentou valores mais baixos para Ipa e um incremento no semicírculo (Rct = 584 Ω) (dados em rosa).

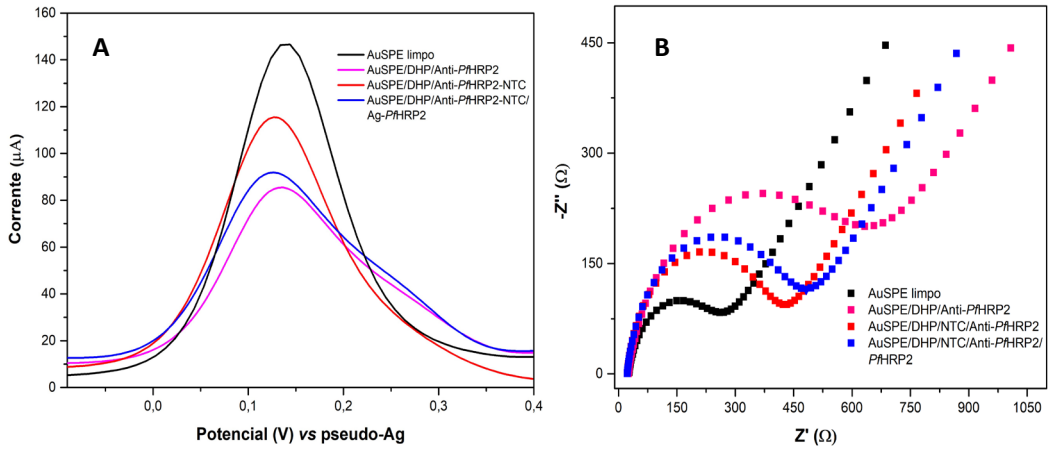

Figura 3.14. Caracterização eletroquímica dos AuSPE modificados com DHP, NTC e Anti-*Pf*HRP2(IgG) em solução de $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ (5 mmol L^{-1}) + KCl (0,1 mol L^{-1}). A: Voltametria de pulso diferencial e B: Espectroscopia de impedância eletroquímica (diagrama de Nyquist),

Tabela 3.4. Parâmetros eletroquímicos obtidos para os eletrodos (AuSPE) funcionalizados com DHP, NTC e Anti-*Pf*HRP2(IgG).

Eletrodo	DVP Ipa (µA)	EIS Rct (Ω)
AuSPE limpo	146,39	223
AuSPE/DHP/Anti-*Pf*HRP2(IgG)	85,42	584
AuSPE/DHP/Anti-*Pf*HRP2(IgG)-NTC	115,48	370
AuSPE/DHP/Anti-*Pf*HRP2(IgG)-NTC/Ag-*Pf*HRP2	91,83	451

Os resultados de EIS indicam que houve um bloqueio parcial da superfície do AuSPE devido ao polímero e aos anticorpos que agem como passivadores da superfície do eletrodo (DIP GANDARILLA *et al.*, 2021a; IBÁÑEZ-REDÍN *et al.*, 2018). O eletrodo AuSPE/DHP/ Anti-*Pf*HRP2(IgG)-NTC (dados em vermelho) conduziu a maiores valores de Ipa e menores valores na resistência calculada (370 Ω) em comparação ao eletrodo modificado sem NTC (dados em rosa). Esse comportamento mais condutor é atribuído à presença dos NTC, que são estruturas com elevada condutividade elétrica e grande área superficial, o que facilita a transferência de elétrons na superfície do eletrodo modificado.

A exposição do eletrodo AuSPE/DHP/Anti-*Pf*HRP2(IgG)-NTC a uma solução contendo o biomarcador específico da malária, o antígeno Ag-*Pf*HRP2 (100 ng mL^{-1}), resultou em nova superfície modificada denominada AuSPE/DHP/Anti-*Pf*HRP2(IgG)-NTC/Ag-*Pf*HRP2 (dados em azul). Neste eletrodo observou-se uma redução no valor de Ipa

e aumento na resistência calculada (Rct = 471 Ω) em comparação com o eletrodo AuSPE/DHP/Anti-*Pf*HRP2(IgG)-NTC. Tais resultados são explicados pelo bloqueio da superfície eletródica por conta da interação dos antígenos com os anticorpos ancorados no eletrodo.

Estudos de microscopia eletroquímica de varredura (do inglês *scanning electrochemical microscopy*, SECM) foram realizados em trabalhos do nosso grupo de pesquisa (DIP GANDARILLA *et al.*, 2021b; ORELLANA CARLOS, 2017). Os resultados mostraram a interação anticorpo-antígeno e corroboraram a influência dos NTC nas propriedades eletroquímicas dos imunossensores. A Figura 3.15 A mostra a imagem óptica do eletrodo AuSPE com 4 diferentes modificações: DHP/Anti-*Pf*HRP2(IgG)-NTC (1) e DHP/Anti-*Pf*HRP2(IgG) (2), DHP/NTC (3) e DHP (4).

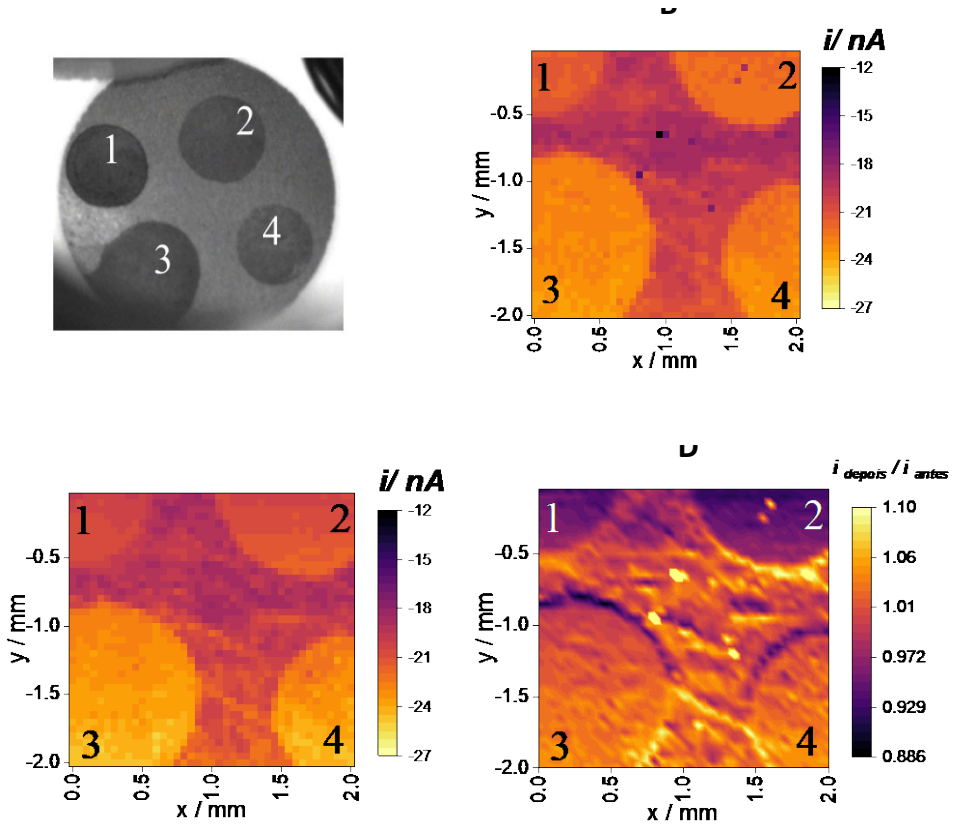

Figura 3.15. A: Imagem óptica do eletrodo de ouro modificado com diferentes materiais: (1) DHP/Anti-*Pf*HRP2(IgG)-NTC, (2) DHP/Anti-*Pf*HRP2(IgG), (3) DHP/NTC e (4) DHP. Imagens SECM obtidas em solução de $[Fe(CN)_6]^{3-}$ 10 mM + KCl 0,1M, B: antes e C: após exposição à solução de Ag-*Pf*HRP2. D: Mapa de correntes normalizada para os 4 diferentes eletrodos modificados [Adaptada de DIP GANDARILLA *et al.*, 2021b].

Menores valores de corrente foram obtidos quando a sonda SECM estava posicionada acima de regiões modificadas com anticorpos (regiões 1 e 2, Figura 3.15 B), e o maior valor de corrente foi registrado para a região contendo apenas DHP/NTC (Figura 3.15 B, região 3). Esses resultados estão de acordo com os resultados obtidos por CV e EIS, indicando que a presença do anticorpo contribui para a passivação local da superfície de ouro modificada, e confirmam que os NTC melhoram as propriedades condutoras do sistema.

As imagens SECM foram repetidas na mesma região, porém após a incubação dos materiais em solução contendo Ag-*Pf*HRP2 durante 30 min. Os resultados (Figura 3.15 C) indicam correntes menores para as regiões contendo anticorpos (1 e 2) (tonalidade mais escura) em comparação com regiões sem anticorpo (3 e 4). Para uma melhor visualização, a corrente da imagem após a exposição do antígeno foi normalizada pelos valores de corrente obtidos antes da exposição ao biomarcador (Figura 3.15 D). O mapa normalizado evidencia que as correntes da sonda SECM sobre o ouro, DHP e DHP/NTC praticamente não tiveram alterações, enquanto os valores de corrente para os materiais contendo o anticorpo na ausência e presença de NTC (DHP/Anti-*Pf*HRP2(IgG) e DHP/Anti-*Pf*HRP2(IgG)-NTC) tiveram variação de aproximadamente 10%. Desta forma, demonstra-se o funcionamento do imunossensor para a detecção do antígeno devido à passivação da superfície eletroativa de maneira seletiva e local.

Os estudos de quantificação de Ag-*Pf*HRP2 usando o imunossensor AuSPE/DHP/Anti-*Pf*HRP2(IgG)-NTC serão realizados futuramente com objetivo de diminuir os limites de detecção e melhorar o desempenho dos imunossensores baseados no uso do DHP.

3.3. Imunossensor Baseado em Polímeros Condutores (AuSPE/P(Py-Py3COOH)/Anti-*Pf*HRP2(IgY)/BSA)

O processo de fabricação do imunossensor é representado na Figura 3.16. A, onde a imobilização acontece mediante ligação covalente dos anticorpos aos grupos carboxílicos ativados (via éster intermediário) presentes na superfície do eletrodo de ouro modificado com o filme polimérico. Realizou-se o bloqueio com BSA para desativar os possíveis grupos carboxílicos que não foram ligados aos anticorpos na superfície do eletrodo e evitar ligação inespecífica dos antígenos durante a etapa de detecção. Posteriormente, na detecção do analito alvo, o Ag-*Pf*HRP2 interage de forma seletiva com os anticorpos, levando a mudanças na resposta eletroquímica, que foram registradas por EIS.

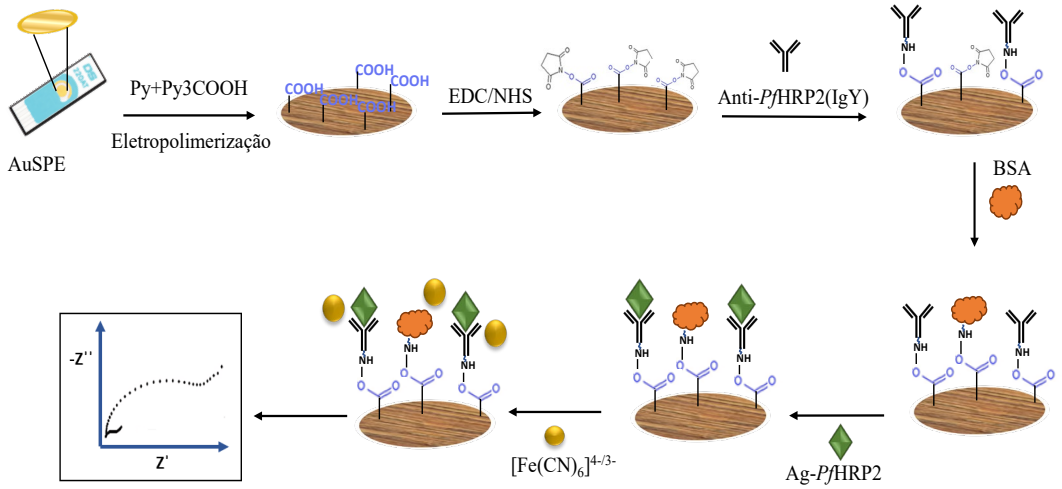

Figura 3.16. Representação esquemática do processo de fabricação do imunossensor AuSPE/P(Py-Py3COOH)/Anti-*Pf*HRP2(IgY)/BSA e detecção do Ag-*Pf*HRP2.

O processo de obtenção do copolímero P(Py-Py3COOH) foi realizado através de eletropolimerização dos monômeros em solução aquosa, usando PBS como eletrólito suporte (Figura 3.17 A). O voltamograma registrou um comportamento irreversível, com um aumento nos valores de corrente anódica desde 0,25 V até 1 V. Durante primeiro ciclo foi registrado um pico de oxidação máximo em 0,6 V que desaparece nos subsequentes ciclos, onde acontece uma diminuição nos valores de corrente anódica. Este comportamento evidencia que o copolímero foi depositado sobre a superfície dos AuSPE. Além do mais, foi claramente observado a olho nu a formação de um filme de cor marrom na área do eletrodo de trabalho.

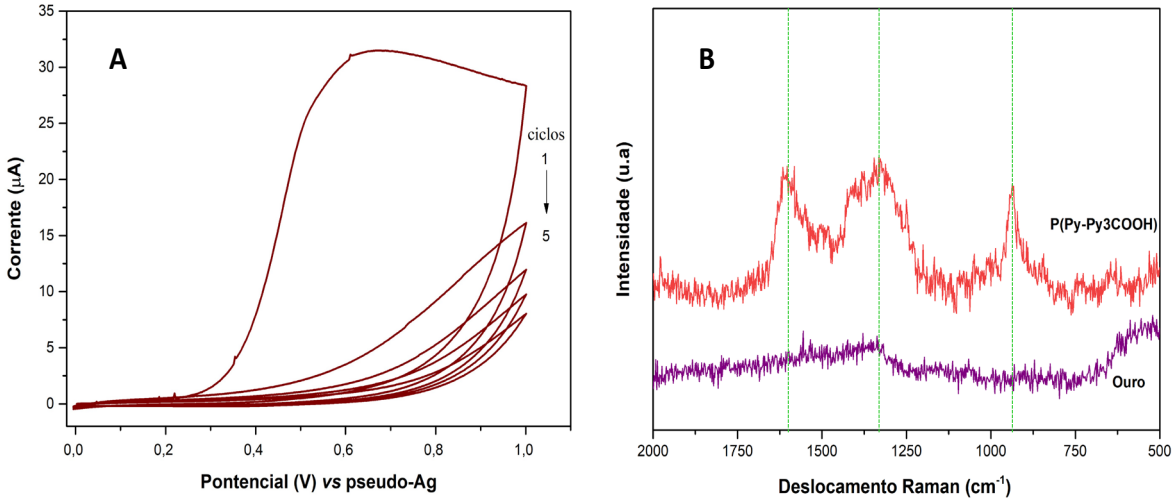

Figura 3.17. A:Voltamograma cíclico do processo de eletropolimerização do copolímero P(Py-Py3COOH) em solução de PBS 0,1 $molL^{-1}$ pH7. B: Espectro Raman de AuSPE limpo e modificado com P(Py-Py3COOH).

A caracterização estrutural da superfície foi realizada por espectroscopia Raman, e os resultados são mostrados na Figura 3.17 B. Como era esperado, o espectro do eletrodo de ouro limpo não registrou nenhum sinal. Já a amostra do copolímero (P(Py-Py3COOH) depositado sobre o eletrodo registrou três bandas na região compreendida entre 500 e 2000 cm^{-1}, que são características do PPy. O sinal observado em 935 cm^{-1} está relacionado as deformações do anel aromático C-C (*bipolarons*). A banda D registrada em 1330 cm^{-1} corresponde a ligações C–C no anel aromático e alongamentos antissimétricos C-N. A banda G em 1600 cm^{-1} é característica de vibrações C=C no anel e alongamento C-C entre anéis. Vários autores reportaram resultados similares para PPy sintetizado mediante polimerização química ou eletropolimerização (CHOI *et al.*, 2020; KIM *et al.*, 2016; ŠETKA *et al.*, 2019; TANG *et al.*, 2017).

3.3.1. Caracterização Morfológica e Análise Elementar

A imagem de MEV do AuSPE limpo (Figura 3.18 A) revela uma superfície irregular e heterogênea, com aparência esponjosa e formação de grãos do metal de diferentes tamanhos, o que pode estar relacionado ao processo de deposição da tinta de ouro utilizada na fabricação dos eletrodos impressos.

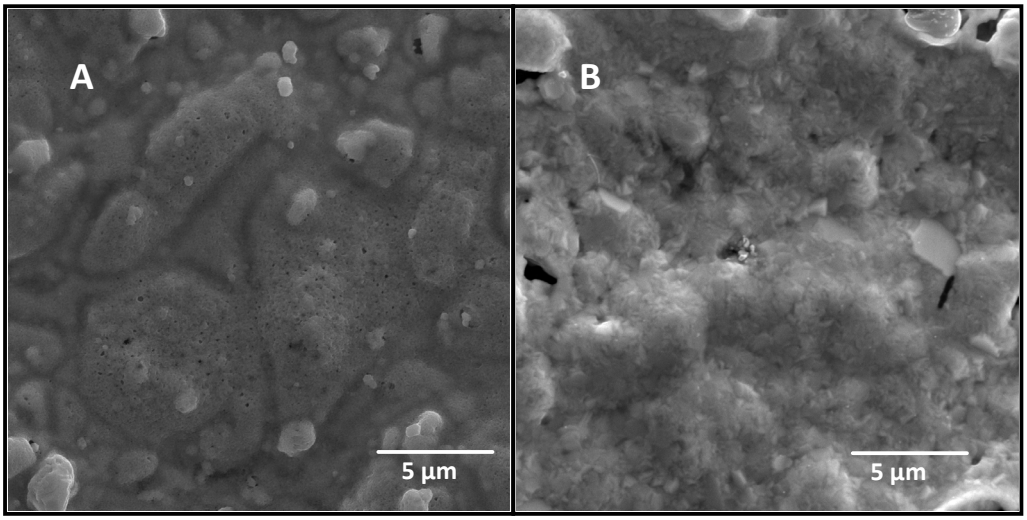

Figura 3.18. Imagens de MEV de A: AuSPE limpo e B: AuSPE/P(Py-Py3COOH).

Depois da deposição do filme polimérico foram observadas diferenças na morfologia, com um aumento da irregularidade da superfície e formação de estruturas compactas, similares a escamas, que recobrem a superfície do eletrodo (Figura 3.18 B). Estas modificações morfológicas confirmam a deposição do copolímero sobre o AuSPE.

Análise elemental por EDS foi realizado para estudar a composição atómica da superfície. O espectro EDS do AuSPE limpo (Figura 3.19 A) revelou os átomos de Au (45%) como elemento maioritário. No entanto, outros elementos como C e O também foram detectados e podem estar relacionados a solventes orgânicos presentes na tinta usada para a fabricação dos eletrodos (GOMES *et al.*, 2018).

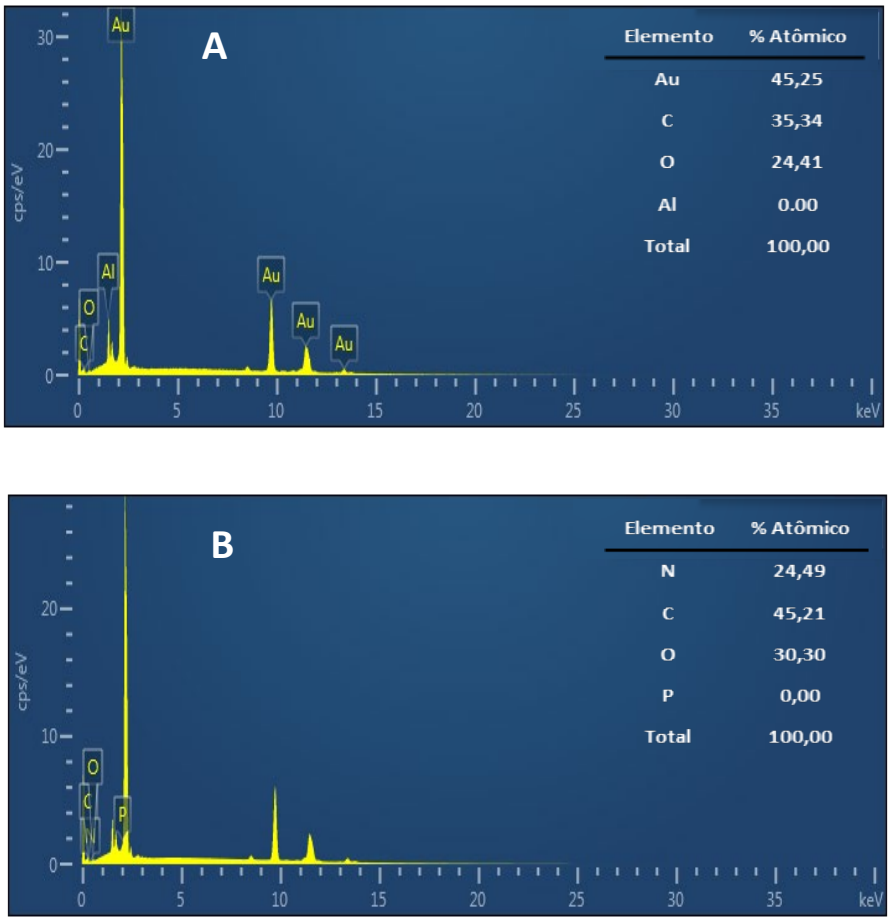

Figura 3.19. Espectros EDS de A: AuSPE e B: P(Py-Py3COOH).

Por outro lado, o espectro EDS da amostra polimérica (Figura 3.19 B) registrou átomos de carbono (45,21%), nitrogênio (24,94%) e oxigênio (30,3%). Esses átomos compõem o anel aromático e os grupos funcionais do P(Py-Py3COOH), pelo que sua identificação confirma a presença do copolímero na superfície do eletrodo.

3.3.2. Caracterização Eletroquímica

A caracterização eletroquímica das etapas de fabricação do imunossensor AuSPE/P(Py-Py3COOH)/Anti-*Pf*HRP2(IgY)/BSA foram verificadas por EIS (Figura 3.20)

e os valores de Rct calculados usando o circuito equivalente de Randles (inserido na Figura 3.20 A e B). Primeiramente, foi estudada a resposta impedimétrica do AuSPE antes e após eletropolimerização. O eletrodo limpo mostrou um perfil pouco resistivo, com um pequeno semicírculo a altas frequências e baixos valores de Rct= 7,71 Ω (gráfico de Nyquist inserido na Figura 3.20 A). Já o AuSPE/P(Py-Py3COOH) registrou elevados valores de impedância (|Z|) em comparação ao eletrodo limpo (gráfico de Bode, Figura 3.20 A).

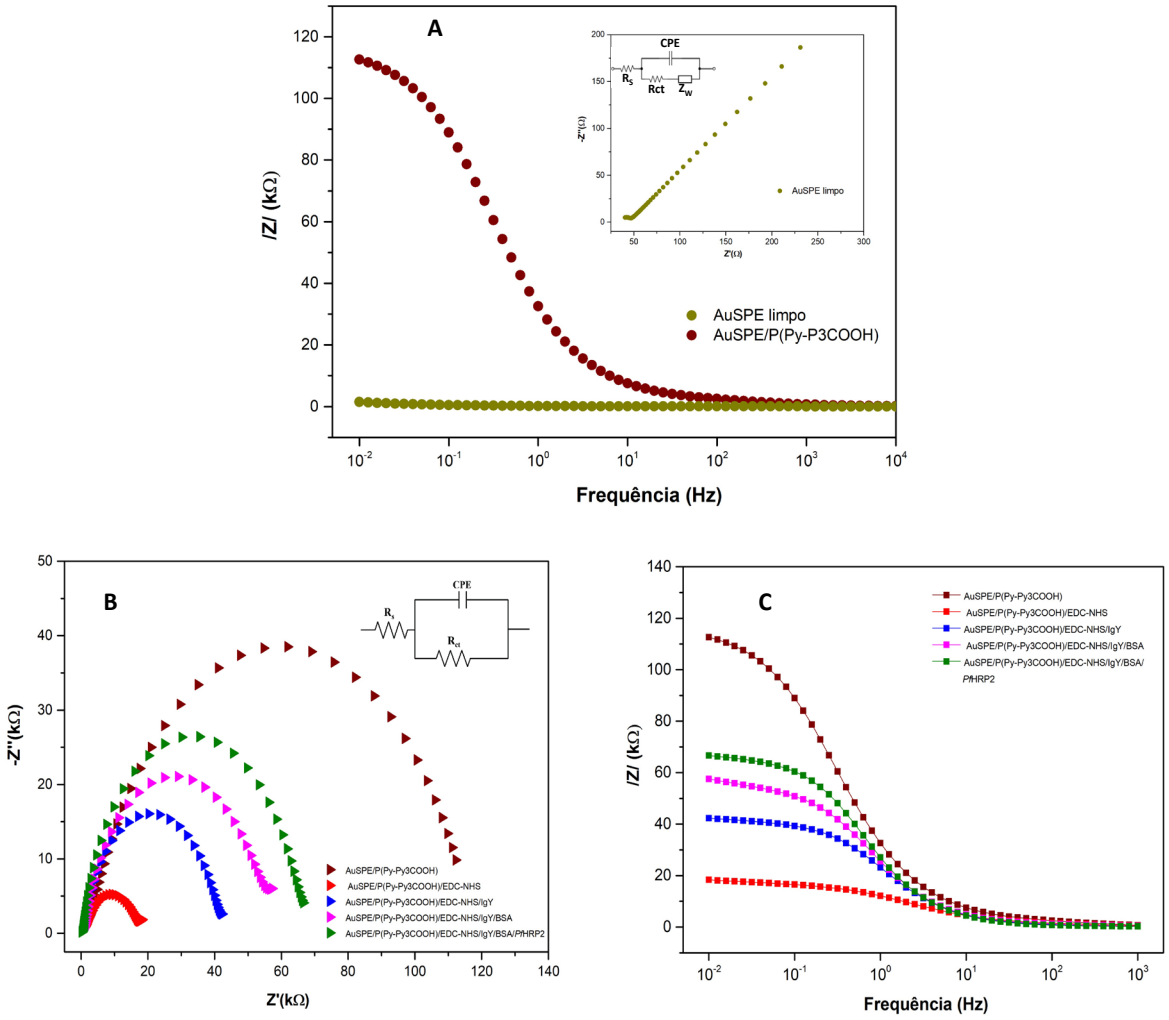

Figura 3.20. A: Gráfico de Bode do eletrodo de AuSPE antes e após modificação com o filme polimérico (inserido diagrama de Nyquist do AuSPE limpo), B: Gráfico de Nyquist e C: Gráfico de Bode das etapas de fabricação do imunossensor em solução de $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ (5 mmol L^{-1}) + KCl (0,1 mol L^{-1}).

No diagrama de Nyquist (Figura 3.20 B), foi observado perfil resistivo, com um grande semicírculo e altos valores de resistência a transferência de carga (115 kΩ) para o AuSPE/P(Py-Py3COOH). Este comportamento pode ser atribuído as características

isolantes do copolímero, que são intensificadas pela presença na superfície dos grupos COOH carregados negativamente, e interagem de forma repulsiva com a prova eletroquímica ($[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$), também com cargas negativas (TRUONG *et al.*, 2011; YUAN *et al.*, 2015).

Inicialmente, as medidas foram realizadas em uma faixa de frequência de 10 kHz a 10 mHz (Figura 3.20 A). No entanto, com objetivo de diminuir o tempo de medição e devido os processos de Rct foram registrados em valores de frequências menores, foi definida uma faixa de trabalho mais apropriada para a realização da caracterização (1000 Hz - 10 mHz). Em seguida, na etapa de ativação com EDC/NHS, a superfície do eletrodo se carrega positivamente devido à formação de ésteres intermediários, que atraem a prova eletroquímica e resulta em uma diminuição significativa dos valores de resistência calculados (15,9 kΩ). As reações usando agentes de ligação são amplamente utilizadas para acoplar covalentemente biomoléculas a superfícies com grupos carboxílicos terminais e têm sido reportado por vários autores (SINGH *et al.*, 2017; TERTIS *et al.*, 2018; YUAN *et al.*, 2015).

O acoplamento dos anticorpos (Anti-*Pf*HRP2 (IgY)) resultou em um incremento da resistência (40,5 kΩ), consequência das caraterísticas isolantes destas estruturas. O bloqueio com a proteína BSA mostrou o mesmo comportamento da etapa anterior (53,0 kΩ). Na etapa final, após o processo de incubação em solução da proteína recombinante *Pf*HRP2 (500 ng mL^{-1}) os valores de impedância incrementaram (Figura 3.20 B e C), registrando maiores valores de Rct (65,3 kΩ), produto a ligação anticorpo-antígeno, que bloqueia a superfície do eletrodo e impede a transferência de carga.

Durante a etapa de imobilização dos Anti-*Pf*HRP2(IgY) sobre os eletrodos modificados foi usada uma concentração de 0,2 μg μL^{-1}, baseado no estudo publicado por Figueiredo e colaboradores (2015) que utilizaram anticorpos provenientes da gema de ovo e obtiveram boa resposta para detecção de biomarcadores de dengue sob essas condições experimentais (FIGUEIREDO *et al.*, 2015). Por outro lado, o tempo de incubação em solução de anticorpo foi otimizado, com objetivo de diminuir o tempo de fabricação do imunossensor.

A Figura 3.21 mostra um aumento na variação da resistência a transferência de carga (ΔR) ($\Delta R = Rct_{(após\ IgY)} - Rct_{(antes\ IgY)}$) a medida que aumenta o tempo de incubação. Foi

escolhido 4h como tempo de incubação adequado para a imobilização, pois não foram observadas alterações consideráveis nos valores de ΔR nos tempos superiores.

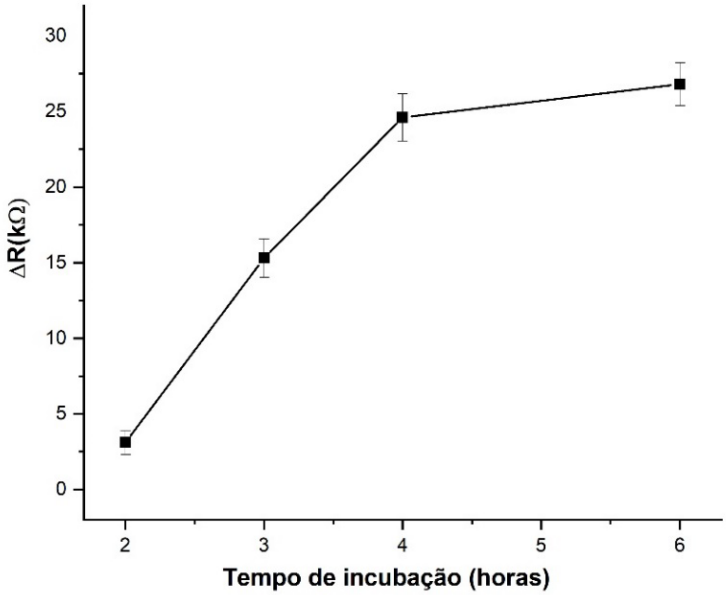

Figura 3.21. Otimização do tempo de incubação em solução de Anti-*Pf*HRP2(IgY).

3.3.3. Detecção do Biomarcador Ag-*Pf*HRP2 e Estudo de Moléculas Interferentes

Para a determinação analítica da proteína recombinante *Pf*HRP2, o comportamento eletroquímico do imunossensor foi registrado após incubação em soluções do analito de diferentes concentrações. Os resultados da Figura 3.22 A (gráfico de Nyquist) evidenciam um aumento gradual no tamanho semicírculo à medida que aumenta a concentração de *Pf*HRP2. O mesmo comportamento foi observado no gráfico de Bode (Figura 3.22 B) que registra um aumento nos valores de |Z| e ângulo de fase à medida que aumenta a concentração de *Pf*HRP2.

O sistema se torna mais resistivo, devido a presença de uma concentração maior do analito alvo, um maior número de moléculas do antígeno se liga aos anticorpos imobilizados na superfície do eletrodo. Na curva de calibração foi representada a variação de resistência a transferência de carga ($\Delta R = Rct_{(após\ Pf HRP2)} - Rct_{(antes\ Pf HRP2)}$) *versus* concentração de *Pf*HRP2 (Figura 3.23 A). O LD calculado para o método foi 27,47 ng mL^{-1} e a equação da reta foi definida como $\Delta R(k\Omega) = 0{,}024[Pf\mathrm{HRP2}] - 0{,}237$ ($R^2 = 0{,}992$).

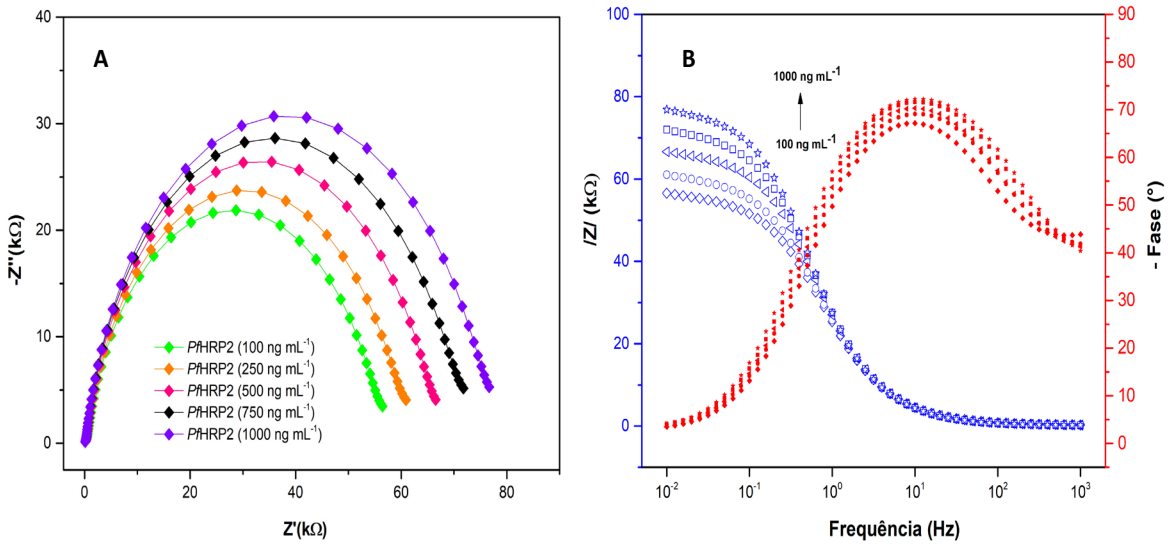

Figura 3.22. EIS do imunossensor após incubação em diferentes concentrações de *Pf*HRP2. A: Diagrama de Nyquist e B: Diagrama de Bode em solução de $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ (5 mmol L^{-1}) + KCl (0,1 mol L^{-1}).

Os resultados do ensaio ELISA mostraram um incremento proporcional dos valores de D.O à medida que a concentração de *Pf*HRP2 aumenta (Figura 3.23 B). Estabeleceu-se uma relação linear na faixa de 100 - 1000 ng mL^{-1}, com LD de 53,95 ng mL^{-1}. A equação da reta foi definida como $D.O = 4{,}17 \times 10^{-4}[Pf\text{HRP2}] + 0{,}409$ ($R^2 = 0{,}984$). Estes resultados estão em correspondência com a curva de calibração obtida por EIS, e com ambos os métodos foi detectado um faixa de concentração de antígeno que é característico de malária severa (CASTRO-SESQUEN *et al.*, 2016; HENDRIKSEN *et al.*, 2013).

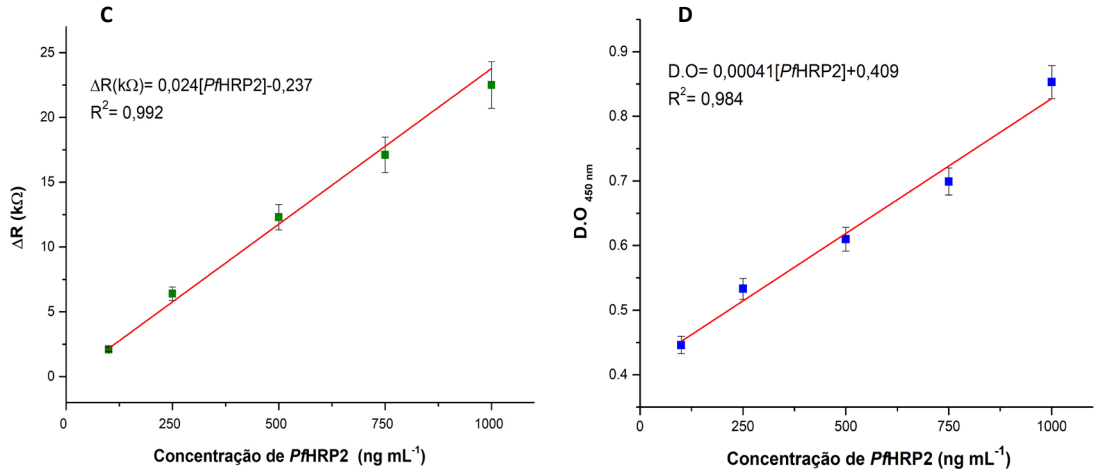

Figura 3.23. A: Curva de calibração obtida por EIS em solução de $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ (5 mmol L^{-1}) + KCl (0,1 mol L^{-1}) (ΔR *vs* concentração de *Pf*HRP2) e B: Curva de calibração obtida no ensaio ELISA (D.O *vs* concentração de *Pf*HRP2).

O estudo de moléculas interferentes constituiu uma etapa importante no desenvolvimento de imunossensores para futura aplicação em amostras reais, já que permite determinar a seletividade do dispositivo para evitar resultados falsos positivos. Os testes foram realizados incubando os imunossensores em soluções binarias (*Pf*HRP2 + molécula interferente) e medido o comportamento eletroquímico por EIS. A ΔR foi calculada a partir da Rct registrada antes e após incubação nas soluções binarias. Os resultados da Figura 3.24 mostram que o aumento de ΔR na presença dos compostos interferentes foi menos de um 7% em todos os casos, confirmando a seletividade do dispositivo para detectar o analito alvo.

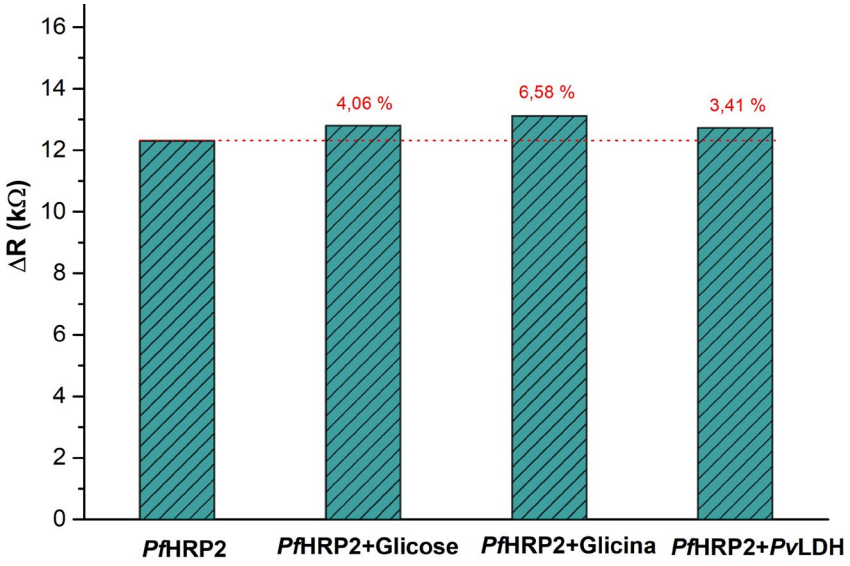

Figura 3.24. Estudo de possíveis moléculas interferentes na detecção de *Pf*HRP2. EIS em solução de $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ (5 mmol L^{-1}) + KCl (0,1 mol L^{-1})

3.4. Imunossensor Baseado em Monocamadas Automontadas (AuDE/Cis/Glut/Anti-*Pv*LDH(IgY)/BSA)

As etapas de fabricação do imunossensor AuDE/Cis/Glut/Anti-*Pv*LDH(IgY)/BSA são representadas a na Figura 3.25. Primeiramente, a incubação em solução de cisteamina leva à formação espontânea de uma monocamada sobre a superfície do AuDE mediante uma interação forte ouro-enxofre e os grupos amino (NH_2) terminais ficam expostos ao ambiente circundante. Esta camada externa de aminas primarias é modificada pela reação com glutaraldeído, que apresenta duas funções terminais H-C=O, onde uma delas reage com as aminas por meio de um mecanismo de adição nucleofílica, formando ligações covalentes tipo imina (C=N) (MOREIRA *et al.*, 2013).

Posteriormente, na etapa de imobilização, os anticorpos são ligados covalentemente à função aldeído presente na camada externa. A modificação com BSA foi realizada para boquear a superfície de ouro não modificada e as funções aldeído que não interagiram com os anticorpos, evitando assim possíveis ligações inespecífica do antígeno durante a etapa de detecção. Para a detecção do analito alvo, o Ag-*Pv*LDH interage de forma seletiva com os anticorpos, levando a mudanças na resposta eletroquímica, que foram registradas por DPV.

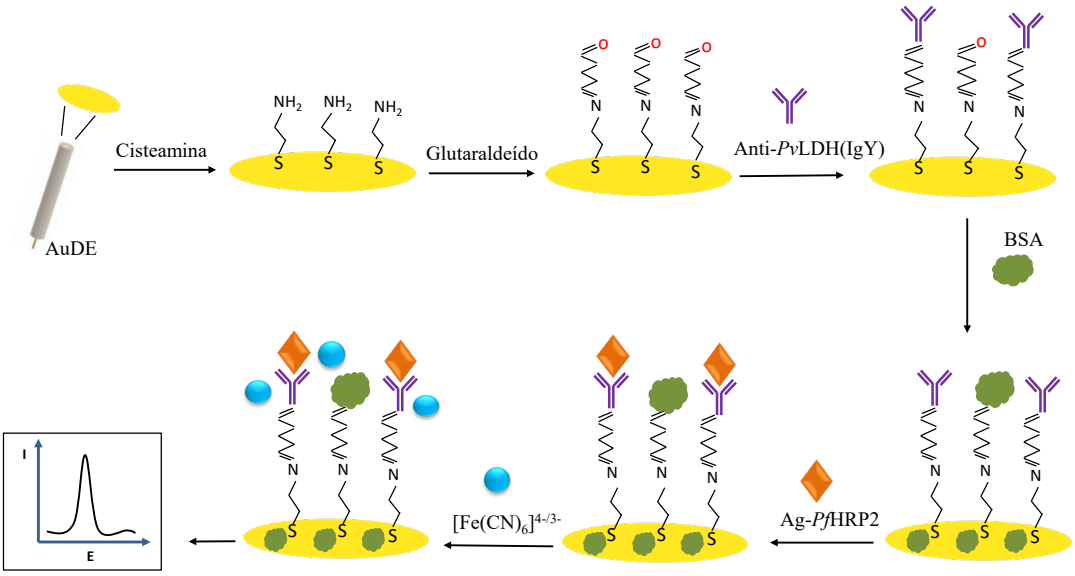

Figura 3.25. Representação esquemática do processo de obtenção do imunossensor AuDE/Cis/Glut/Anti-*Pv*LDH(IgY)/BSA e detecção de Ag-*Pv*LDH.

A hidrofobicidade/hidrofilicidade de uma superfície pode ser avaliada através de medidas de ângulo de contato (hidrofílica (<90°), hidrofóbica (>90°) ou super hidrofóbica (>150°)), e quanto menor o ângulo registrado maior a interação do líquido com a superfície sólida em contato (FARIAS, 2021; GAMA, 2014). Para o eletrodo de ouro limpo foi calculado um ângulo de contato de 45,65° e após a modificação com cisteamina o valor decresceu para 18,19° (Figura 3.26 A e B, respectivamente).

Resultados similares foram obtidos por outros autores (OUERGHI *et al.*, 2016; YU *et al.*, 2019) e podem ser explicados pela presença de grupos amino terminais na estrutura da cisteamina, que ficam livres na formação das SAMs, atribuindo maior hidrofilicidade à superfície. As medidas de ângulo de contato fornecem evidências adicionais de que a monocamada foi formada no eletrodo de ouro.

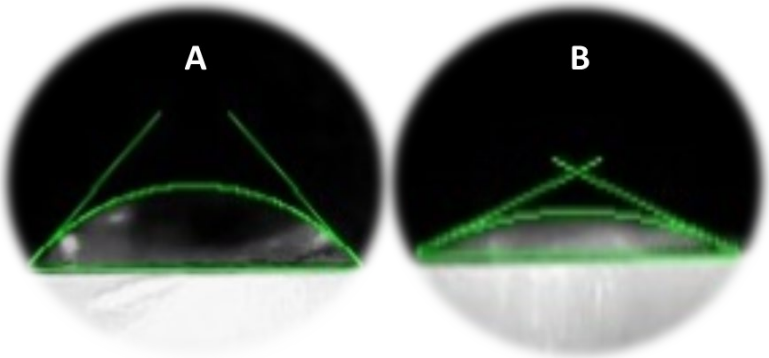

Figura 3.26. Imagens de ângulo de contato para A: AuDE limpo e B: AuDE/Cisteamina.

3.4.1. Caraterização Eletroquímica

As etapas de modificação do AuDE foram seguidas por DPV (Figura 3.27). A montagem gradual das moléculas de cisteamina e glutaraldeído no eletrodo de ouro é acompanhada por uma diminuição da resposta amperométrica (Tabela 3.5), quando comparado ao eletrodo limpo, impossibilitando o acesso da prova redox até o eletrodo. A pH = 7,4, a maioria dos grupos amino da cisteamina são quase-neutros e a camada de cisteamina exibe um comportamento isolante (OUERGHI *et al.*, 2016). Este comportamento foi reportado por vários autores, que usaram a metodologia de formação de SAMs no desenvolvimento de biossensores (MOREIRA *et al.*, 2013; OUERGHI *et al.*, 2016; PIMENTA-MARTINS *et al.*, 2012).

Após a imobilização dos anticorpos tipo IgY, acontece uma diminuição nos valores de Ipa, comparado a etapa de modificação anterior, devido ao grande tamanho destas biomoléculas (~180 kDa) (MUNHOZ *et al.*, 2014), o que bloqueia a superfície do eletrodo e dificulta o acesso do $[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$ ao eletrodo. Na etapa subsequente, com a presença do BSA (~66 kDa) registrou-se um comportamento similar ao anterior, justificado pela existência de outra proteína também de grande tamanho molecular e com características isolantes. Quando o imunossensor foi incubado em solução de Ag-*Pv*LDH (10 µg mL^{-1}) foi observada uma diminuição dos valores de Ipa, quando comparado aos registrados para AuDE/Cis/Glut/Anti-*Pv*LDH(IgY)/BSA, o que evidencia a interação Ac-Ag e demostra a eficácia do teste para detectar o analito alvo.

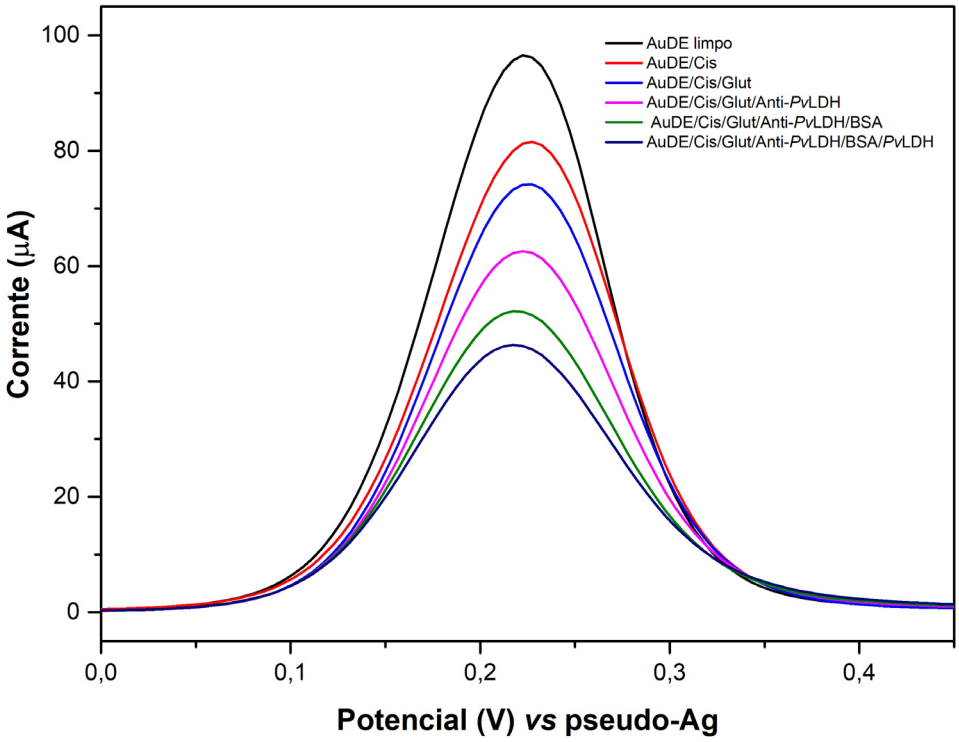

Figura 3.27. DPV das diferentes etapas de modificação dos AuDE em solução de $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ (5 mmol L^{-1}) + KCl (0,1 mol L^{-1}).

Tabela 3.5. Valores de corrente de pico anódico obtidas na DPV para as diferentes etapas de modificação dos AuDE.

Eletrodo	DVP Ipa (μA)
AuDE limpo	96,43
AuDE/Cis	81,62
AuDE/Cis/Glut	74,17
AuDE/Cis/Glut/Anti-*Pv*LDH	62,57
AuDE/Cis/Glut/Anti-*Pv*LDH/BSA	52,16
AuDE/Cis/Glut/Anti-*Pv*LDH/BSA/*Pv*LDH	46,30

A etapa de formação das SAMs sobre a superfície do AuDE foi otimizada, sendo estudados três tempos de imersão em solução de cisteamina 50 mmol L^{-1} (2, 3 e 4h). Os resultados mostram uma diminuição nos valores de Ipa à medida que aumenta o tempo de incubação (Figura 3.28 A). A ΔIpa ($Ipa_{antes\ cisteamina} - Ipa_{após\ cisteamina}$) foi calculada (Figura 3.28 B) e escolhido 4h como tempo de imersão ótimo para a formação das SAMs, onde obteve-se o maior valor de ΔIpa.

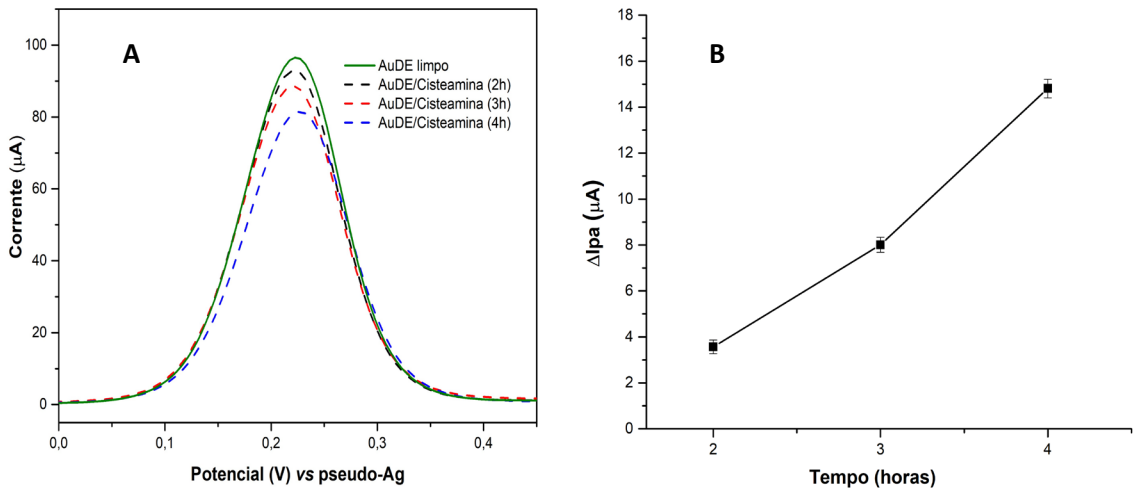

Figura 3.28. Otimização do tempo de imersão em solução de cisteamina para a formação das SAMs. A: DPV em solução de $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ (5 mmol L^{-1}) + KCl (0,1 mol L^{-1}). B: ΔIpa *vs* tempo de incubação.

Foi usada uma concentração de anticorpos de 0,2 μg μL^{-1} baseado nos reportes de Figueiredo e colaboradores (2015), que desenvolveram exitosamente um imunossensor para a detecção de dengue por meio de imobilização de anticorpos de gema de ovo sobre eletrodos de ouro mediante monocamadas automontadas (FIGUEIREDO *et al.*, 2015). O tempo de incubação usado foi de 4h, baseado nos resultados dos testes de otimização realizados no item 3.3.2 para os anticorpos Anti-*Pf*HRP2(IgY), que foram produzidos sob as mesmas condições que os Anti-*Pv*LDH (IgY).

3.4.2. Detecção do Biomarcador *Pv*LDH e Estudo de Moléculas Interferentes

Para os ensaios de detecção do analito alvo, o imunossensor foi incubado em soluções padrões de Ag-*Pv*LDH de diferentes concentrações e a resposta eletroquímica medida por DPV. Os resultados mostraram uma diminuição nas correntes de pico anódico à medida que aumenta a concentração do antígeno, produzida pelo aumento da passivação do eletrodo em maiores concentrações (Figura 3.29 A). Obteve-se uma relação linear entre ΔIpa e concentração de *Pv*LDH na faixa de 10 - 50 μg mL^{-1}, com LD= 455 ng mL^{-1}. A variação de corrente de pico anódico (ΔIpa) foi calculada a partir dos valores de Ipa antes e após incubação em solução de *Pv*LDH ($\Delta Ipa = Ipa_{(antes\ PvLDH)} - Ipa_{(após\ PvLDH)}$). A equação da reta foi definida como $\Delta I_{pa}(\mu A) = 0{,}405[PvLDH] + 1{,}93$ $(R^2 = 0{,}995)$ (Figura 3.29 B).

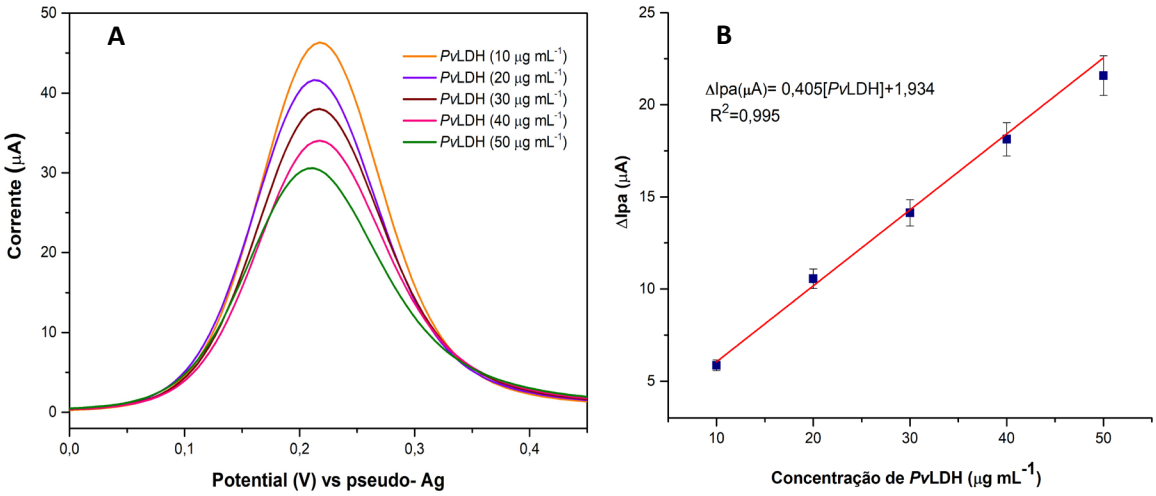

Figura 3.29. A: Resposta do imunossensor após incubação em diferentes concentrações de Ag-*Pv*LDH. A: DPV em solução de $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ (5 mmol L^{-1}) + KCl (0,1 mol L^{-1}). B: Curva de calibração (ΔIpa *vs* concentração de *Pv*LDH).

Para o teste de possíveis moléculas interferentes, o imunossensor foi incubado em soluções binárias (*Pv*LDH + interferente) e medida a resposta eletroquímica por DPV antes e após o procedimento. A partir dos valores de ΔIpa calculados, é possível observar que a resposta eletroquímica sofre uma alteração menor de 8% para os três compostos estudados (Figura 3.30), confirmando que o método apresenta boa seletividade para a detecção do analito alvo.

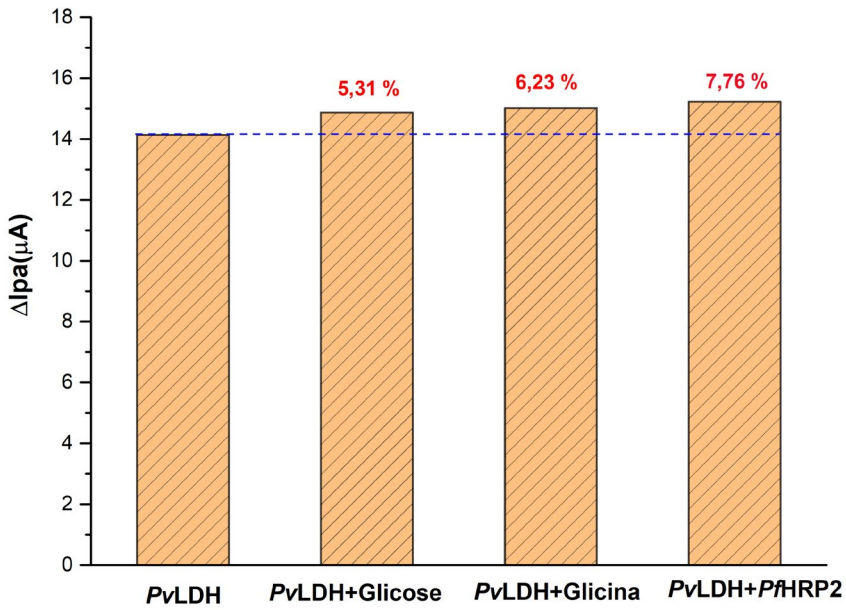

Figura 3.30. Estudo de possíveis moléculas interferentes na detecção de *Pf*HRP2. DPV em solução de $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ (5 mmol L^{-1}) + KCl (0,1 mol L^{-1}).

3.5. Comparação com Biossensores Reportados na Literatura

Neste tópico é feita uma comparação entre os imunossensores desenvolvidos neste trabalho e outros biossensores que são reportados na literatura para a determinação dos biomarcadores da malária (HRP2 e LDH). Na Tabela 3.6. são mencionadas diferentes metodologias descritas para a detecção de Ag-*Pf*HRP2, sendo capazes de detectar baixas concentrações de analito, na faixa dos ng mL^{-1} a fg mL^{-1}.

Neste trabalho foram desenvolvidos dois imunossensores (AuDE/DHP/Anti-*Pf*HRP2(IgG) e AuSPE/P(Py-Py3COOH)/Anti-*Pf*HRP2(IgY)/BSA) para determinação de Ag-*Pf*HRP2 (item 3.2 e 3.3, respectivamente). Ambas as metodologias propostas são simples, de fácil execução, com curto tempo de fabricação, usam reagentes relativamente baratos, apresentaram alta sensibilidade (LD na faixa dos ng mL^{-1}) e boa seletividade. Apesar da maioria dos biossensores referenciados registrarem menores LD, eles são plataformas complexas, com maior número de etapas durante a fabricação e usam reagentes e materiais caros para melhorar o desempenho dos dispositivos (exemplo: NTC, nanopartículas de ouro, esferas magnéticas, íons líquidos, nanofibras ou pontos quânticos). Baseado no exposto anteriormente, consideramos que nossos imunossensores são dispositivos com uma boa relação custo/simplicidade/desempenho e com potencialidades para sua aplicação no diagnóstico de malária causada por *Plasmodium falciparum* (segunda espécie predominante na região Amazônica e que provoca maior número de casos de malária grave).

Tabela 3.6. Comparação dos diferentes métodos previamente reportados para a detecção de Ag-*Pf*HRP2.

Sistema	Princípio do Método	LD	Referência
Imunoensaio	ELISA kit malária Ag-*Pf*HRP2	25 pg mL^{-1}	(JANG *et al.*, 2018)
Imunoensaio	Anticorpos conjugados a esferas magnéticas e pontos quânticos.	0,5 ng mL^{-1}	(CASTRO-SESQUEN *et al.*, 2016)
Imunossensor	Eletrodos de ouro modificados com nanopartículas de ouro coloidal e anticorpos.	36 pg mL^{-1}	(HEMBEN *et al.*, 2017)
Imunossensor	Eletrodos de grafite-epóxi modificados com anticorpos ligados a esferas magnéticas e nanopartículas.	0,36 ng mL^{-1}	(DE SOUZA CASTILHO *et al.*, 2011)
Imunossensor	Eletrodos de ouro modificados com NTC-nanofibras de ZnO e anticorpos.	0,97 fg mL^{-1}	(PAUL *et al.*, 2017)

Imunossensor	Cristal de quartzo revestido de ouro modificado com monocamadas automontadas de ácido tióctico, 1-dodecanotiol e anticorpos.	12 ng mL^{-1}	(SHARMA *et al.*, 2011)
Aptassensor	Eletrodos de ouro modificados com propionato de di-tiobis-succinimidil e aptâmero funcionalizado com aminas.	3,15 pmol L^{-1}	(CHAKMA *et al.*, 2018)
Imunossensor	Eletrodos de ITO modificados com anticorpo primário e anticorpo secundário marcado com azul de metileno	1pg mL^{-1}	(DUTTA *et al.*, 2017)
Imunossensor	Eletrodos de ouro modificados com DHP e anticorpos tipo IgG.	2,8 ng mL^{-1}	Este trabalho
Imunossensor	Eletrodos de ouro modificados com PPy carboxilado e anticorpos tipo IgY.	27,47 ng mL^{-1}	Este trabalho

Por outro lado, o imunossensor AuDE/Cis/Glut/Anti-*Pv*LDH(IgY)/BSA descrito neste trabalho para determinação de Ag-*Pv*LDH (item 3.4) registrou um LD maior que os biossensores reportados por outros autores (Tabela 3.7). Esta menor sensibilidade pode estar relacionada a algum problema durante a purificação dos anticorpos, (procedimento que ainda está sendo otimizado), o que pode influenciar negativamente na quantidade e eficiência dos anticorpos imobilizados na superfície dos eletrodos.

No entanto, o dispositivo é de fácil desenvolvimento, livre de marcadores, registrou um LD = 455 ng mL^{-1} na detecção do antígeno e usa anticorpos produzidos em galinhas (tipo IgY), que baseado em nossa revisão bibliográfica, não têm sido aplicados no desenvolvimento de imunossensores para detectar malária. Consideramos que com a otimização do processo de obtenção e purificação dos anticorpos, o desempenho do dispositivo pode ser melhorado e a metodologia proposta empregada como uma alternativa para determinação de malária causada por *Plasmodium vivax* (principal espécie que provoca a doença na região Amazônica).

Tabela 3.7. Comparação dos diferentes métodos previamente reportados para a detecção de Ag-*p*LDH.

Sistema	Princípio do Método	LD	Referência
Imunoensaio	Microplaca microfluídica modificada com anticorpo de captura-antígeno-anticorpo secundário marcado com HRP.	25 pg mL^{-1}	(LEE *et al.*, 2020)
Imunossensor	Eletrodos impressos de ouro modificados com anticorpos e nanopartículas de ouro	9 pg mL^{-1}	(HEMBEN *et al.*, 2018)

Aptassensor	Imobilização do aptâmero 2008s sobre eletrodos de ouro	0,84 pmol L^{-1}	(FIGUEROA-MIRANDA *et al.*, 2018)
Imunossensor	Eletrodos interdigitados de ouro modificados com 3-aminopropil tri-etoxisilano, glutaraldeído e anticorpos	2,5 ng mL^{-1}	(LOW *et al.*, 2019)
Imunossensor	Eletrodos de ouro modificados com cisteamina, glutaraldeído e anticorpos tipo IgY	455 ng mL^{-1}	Este trabalho

CONCLUSÃO

Três imunossensores foram exitosamente fabricados utilizando diferentes estratégias de funcionalização de eletrodos (matriz polimérica de DHP, eletropolimerização de filmes de polipirrol e formação de camadas automontadas de cisteamina). Os anticorpos Anti-*Pf*HRP2 (tipo IgG e IgY) e Anti-*Pv*LDH(IgY) foram imobilizados de forma satisfatória sobre as superfícies condutoras. Mediante as técnicas eletroquímicas (CV, DPV ou EIS) foi possível registrar as propriedades elétricas em cada etapa de fabricação dos dispositivos e detecção das proteínas recombinantes. As técnicas espectroscópicas (FTIR, EDS ou espectroscopia Raman) e microscópicas (MEV ou AFM) permitiram identificar os principais grupos funcionais dos materiais e estudar a morfologicamente a superfície dos eletrodos modificados, respectivamente.

Na fabricação do imunossensor AuDE/DHP/Anti-*Pf*HRP2(IgG) foram evidenciadas variações nos valores de Ipa e Rct durante a imobilização dos anticorpos e detecção de Ag-*Pf*HRP2. Com as variáveis analíticas otimizadas (concentração de anticorpos e tempo de incubação em antígenos), o imunossensor teve estabilidade e exibiu alta sensibilidade, detectando por DPV uma resposta linear na faixa de 10 - 500 ng mL^{-1}, com LD = 2,8 ng mL^{-1} e por EIS de 10 - 400 ng mL^{-1}, com LD = 3,3 ng mL^{-1}. Estes resultados foram comparados com resultados do teste ELISA, com LD = 5,5 ng mL^{-1}, e ambos os métodos mostraram boa correlação. A seletividade do dispositivo foi constatada, sem interferência de outras moléculas na resposta eletroquímica registrada por DPV e EIS em amostras de soro humano incrementadas com antígeno. Foi demostrado que o acoplamento de NTC aos anticorpos melhora as propriedades elétricas do imunossensor baseado em DHP; estudos que podem ser aprimorados com objetivo de aumentar a sensibilidade do método.

A detecção de *Pf*HRP2 usando o imunossensor AuSPE/P(Py-Py3COOH)/Anti-*Pf*HRP2(IgY)/BSA foi confirmada pelo aumento da Rct registrada após a interação Ac-Ag. O dispositivo mostrou uma boa sensibilidade por EIS, com uma resposta linear na faixa de concentração de 100 a 1000 ng mL^{-1} de *Pf*HRP2, com LD = 27, 47 ng mL^{-1}; resultados que foram corroborados por ELISA, onde foi alcançado um LD de 53,95 ng mL^{-1}. O estudo de moléculas interferentes permitiu concluir que o imunossensor apresenta boa seletividade, sem grande interferência (< 7%) de outras moléculas.

A automontagem de monocamadas de cisteamina sobre a superfície de AuDE foi seguida e otimizada por DPV e consequentemente, aconteceu uma imobilização exitosa

dos Anti-*Pv*LDH(IgY) sobre o eletrodo modificado. O desempenho do imunossensor AuDE/Cis/Glu/Anti-*Pv*LDH(IgY)/BSA foi avaliado, detectando concentrações do analito alvo (*Pv*LDH) na faixa de 10 - 50 µg mL^{-1}, com LD = 455 ng mL^{-1}. Foi constatada boa seletividade, já que em presença de outras possíveis moléculas interferentes a resposta por DPV não foi consideravelmente afetada (< 8%).

Os métodos empregados no desenvolvimento dos imunossensores apresentados neste trabalho são de fácil execução e utilizam reagentes de baixo custo, quando comparados a outros materiais frequentemente utilizados para a modificação de eletrodos. Além disso, foram usados para dois dos imunossensores anticorpos do tipo IgY, produzidos em galinhas, que apresentam algumas vantagens desde o ponto de vista de obtenção e purificação. Os imunossensores com anticorpos IgY mostraram ser capazes de detectar o analito alvo, com resultados aceitáveis quando comparados ao imunossensor que usa anticorpos IgG. Baseado nos resultados alcançados neste projeto, consideramos que os três dispositivos desenvolvidos podem constituir uma alternativa para o diagnóstico da malária.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Os estudos relacionados aos imunossensores desenvolvidos neste trabalho podem ser continuados, com propósito de garantir o melhor desempenho nas medidas de reconhecimento biológico dos antígenos. A seguir, são apresentadas algumas perspectivas futuras:

- Realizar a detecção analítica de Ag-*Pf*HRP2 usando o imunossensor baseado em DHP e NTC acoplados aos anticorpos (Anti-*Pf*HRP2(IgG)-NTC), com intuito de detectar menores concentrações do analito alvo (Ag-*Pf*HRP2);
- Realizar a caracterização espectroscópica do AuDE modificado com cisteamina;
- Melhorar o desempenho do imunossensor baseado em monocamadas automontadas para detecção de Ag-*Pv*LDH;
- Realizar a detecção dos antígenos em um número significativo de amostras de soro, provenientes de pacientes com diagnóstico positivo de malária, usando os imunossensores desenvolvidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTINORI, S.; GALIMBERTI, L.; MILAZZO, L.; CORBELLINO, M. Biology of human malaria plasmodia including *Plasmodium knowlesi*. Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases, v. 4, n. 1, 2012. DOI: 10.4084/MJHID.2012.013.

ARDILA, J. A.; OLIVEIRA, G. G.; ANTIGO MEDEIROS, R.; FATIBELLO-FILHO, O. Square-wave adsorptive stripping voltammetric determination of nanomolar levels of bezafibrate using a glassy carbon electrode modified with multi-walled carbon nanotubes within a dihexadecyl hydrogen phosphate film. Analyst, v. 139, n. 7, p. 1762–1768, 2014. DOI: 10.1039/c3an02016a.

ARIGA, K.; TANAKA, R.; KIKUCHI, J. I.; HIGUCHI, M.; YAMAMOTO, K. Stoichiometric complexes between cyclic phenylazomethines and a dialkyl phosphate for molecular tiling at the air-water interface. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, v. 2, n. 6, p. 669–674, 2002. DOI: 10.1166/jnn.2002.147.

ASHLEY, E. A.; PYAE PHYO, A.; WOODROW, C. J. Malaria. The Lancet, v. 391, n. 10130, p. 1608–1621, 2018. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)30324-6.

BARBER, B. E.; WILLIAM, T.; GRIGG, M. J.; PIERA, K.; YEO, T. W.; ANSTEY, N. M. Evaluation of the Sensitivity of a *p*LDH-based and an aldolase-based rapid diagnostic test for diagnosis of uncomplicated and severe malaria caused by PCR-confirmed *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium falciparum*, and *Plasmodium vivax*. Journal of Clinical Microbiology, v. 51, n. 4, p. 1118–1123, 2013. DOI: 10.1128/JCM.03285-12.

BARD, A.; FAULKNER, L. Electrochemical methods. Fundamentals and applications. Beijing, Chemical Industry Press, 2005.

BERZOSA, P.; LUCIO, A. D. E; BARJA, M. R.; HERRADOR, Z.; GONZÁLEZ, V.; GARCÍA, L.; MARTÍNEZ, A. F.; MORALES, M. S.; NCOGO, P.; VALLADARES, B.; RILOHA, M.; BENITO, A. Comparison of three diagnostic methods (microscopy , RDT , and PCR) for the detection of malaria parasites in representative samples from Equatorial Guinea. Malaria Journal, v.17, n.333, p. 1–12, 2018. DOI: 10.1186/s12936-018-2481-4.

BLAIR TRUJILLO, S.; ÁLVAREZ SÁNCHEZ, G.; VILLA RESTREPO, A.; CARMONA FONSECA, J.; RÍOS OSORIO, L. Nutritional status and immunoglobulin and cytokine concentrations in children with malaria. Anales de Pediatría, v. 58, n. 5, p. 418–424, 2003. DOI: 10.1016/s1695-4033(03)78087-4.

BORTOLUCCI SIMIONI, N.; OLIVEIRA, G. G.; CAMPANHÃ VICENTINI, F.; LANZA, M. R. V.; JANEGITZ, B. C.; FATIBELLO-FILHO, O. Nanodiamonds stabilized in dihexadecyl phosphate film for electrochemical study and quantification of codeine in biological and pharmaceutical samples. Diamond and Related Materials, v. 74, p. 191–196, 2017. DOI: 10.1016/j.diamond.2017.03.007.

BRETT, A.; BRETT, C. Electroquímica. Principios, métodos e aplicações. New York, Oxford University Press, 1993.

BRUNDA, G.; SASHIDHAR, R. B.; SARIN, R. K. Use of egg yolk antibody (IgY) as an immunoanalytical tool in the detection of Indian cobra (Naja naja naja) venom in biological samples of forensic origin. Toxicon, v. 48, n. 2, p. 183–194, 2006. DOI: 10.1016/j.toxicon.2006.04.011.

BUSCAGLIA, C. A.; KRUMM, B.; INGASON, B. P.; LUCAS, R.; ROACH, C. Aldolase provides an unusual binding site for thrombospondin-related anonymous protein in the invasion machinery of the malaria parasite. The National Academy of Sciences of the USA, v. 104, n. 17, p. 7015–7020, 2007. DOI: 10.1073pnas.0605301104.

CAMPANHÃ VICENTINI, F.; GARCIA, L. L.; FIGUEIREDO-FILHO, L. C.; JANEGITZ, B. C.; FATIBELLO-FILHO, O. A biosensor based on gold nanoparticles, dihexadecylphosphate, and tyrosinase for the determination of catechol in natural water. Enzyme and Microbial Technology, v. 84, p. 17–23, 2016. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2015.12.004.

CAMPANHÃ VICENTINI, F.; RAVANINI, A. E.; ALMEIDA SILVA, T.; JANEGITZ, B. C.; ZUCOLOTTO, V.; FATIBELLO-FILHO, O. A novel architecture based upon multi-walled carbon nanotubes and ionic liquid to improve the electroanalytical detection of ciprofibrate. Analyst, v. 139, n. 16, p. 3961–3967, 2014. DOI: 10.1039/c4an00861h.

CAMPUZANO ZULUAGA, G.; BLAIR TRUJILLO, S. Malaria: consideraciones sobre el diagnóstico. La clínica y el laboratorio. Medicina & Laboratorio, v. 16, n. 52, p. 7–8, 2016.

CASALINI, S.; BORTOLOTTI, C. A.; LEONARDI, F.; BISCARINI, F. Self-assembled monolayers in organic electronics. Chemical Society Reviews, v. 46, n. 1, p. 40–71, 2017. DOI: 10.1039/c6cs00509h.

CASTRO-SESQUEN, Y. E.; KIM, C.; GILMAN, R. H.; SULLIVAN, D. J.; SEARSON, P. C. Nanoparticle-based histidine-rich protein-2 assay for the detection of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 95, n. 2, p. 354–357, 2016. DOI: 10.4269/ajtmh.15-0772.

CHAKMA, B.; JAIN, P.; SINGH, N. K.; GOSWAMI, P. Development of electrochemical impedance spectroscopy based malaria aptasensor using HRP-II as target biomarker. Electroanalysis, v. 30, n. 8, p. 1839–1846, 2018. DOI: 10.1002/elan.201800142.

CHIODINI, P. L.; BOWERS, K.; JORGENSEN, P.; BARNWELL, J. W.; GRADY, K. K.; LUCHAVEZ, J.; MOODY, A. H.; CENIZAL, A.; BELL, D. The heat stability of *Plasmodium* lactate dehydrogenase-based and histidine-rich protein 2-based malaria rapid diagnostic tests. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v. 101, n. 4, p. 331–337, 2007. DOI: 10.1016/j.trstmh.2006.09.007.

CHO, I. H.; KIM, D. H.; PARK, S. Electrochemical biosensors: Perspective on functional nanomaterials for on-site analysis. Biomaterials Research, v. 24, n. 1, p. 1–12, 2020. DOI: 10.1186/s40824-019-0181-y.

CHO, I. H.; LEE, J.; KIM, J.; KANG, M. S.; PAIK, J. K.; KU, S.; CHO, H. M.; IRUDAYARAJ, J.; KIM, D. H. Current technologies of electrochemical immunosensors: perspective on signal amplification. Sensors, v. 18, n. 1, p. 1–18, 2018. DOI: 10.3390/s18010207.

CHOI, Y. M.; LIM, H.; LEE, H. N.; PARK, Y. M.; PARK, J. S.; KIM, H. J. Selective nonenzymatic amperometric detection of lactic acid in human sweat utilizing a multi-walled carbon nanotube (MWCNT)-polypyrrole core-shell nanowire. Biosensors, v. 10, n. 9, 2020. DOI: 10.3390/bios10090111.

CORONADO, L. M.; NADOVICH, C. T.; SPADAFORA, C. Malarial hemozoin: from target to tool. Biochimica et Biophysica Acta, v. 1840, n. 6, p. 2032–2041, 2014. DOI:

10.1016/j.bbagen.2014.02.009.

COSTA GARCIA, L. L.; SOARES FIGUEIREDO-FILHO, L. C.; OLIVEIRA, G. G.; FATIBELLO-FILHO, O.; BANKS, C. E. Chemical Square-wave voltammetric determination of paraquat using a glassy carbon electrode modified with multiwalled carbon nanotubes within a dihexadecylhydrogenphosphate (DHP) film. Sensors & Actuators: B. Chemical, v. 181, p. 306–311, 2013. DOI: 10.1016/j.snb.2013.01.091.

COWMAN, A. F.; HEALER, J.; MARAPANA, D.; MARSH, K. Malaria: Biology and Disease. Cell, v. 167, n. 3, p. 610–624, 2016. DOI: 10.1016/j.cell.2016.07.055.

COX, F. E. History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. Parasites & Vectors, v. 3, n. 5, p. 1–9, 2010. DOI:10.1186/1756-3305-3-5.

CRIVIANU-GAITA, V.; THOMPSON, M. Aptamers, antibody scFv, and antibody Fab' fragments: an overview and comparison of three of the most versatile biosensor biorecognition elements. Biosensors and Bioelectronic, v. 15, n. 85, p. 32–45, 2016. DOI: 10.1016/j.bios.2016.04.091.

CURRIE, L. A. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC recommendations 1995). Analytica Chimica Acta, v. 391, p. 105–126, 1999. DOI: 10.1016/S0003-2670(99)00104-X.

DA SILVA, N. S.; DA SILVA-NUNES, M.; MALAFRONTE, R. S.; MENEZES, M. J.; D'ARCADIA, R. R.; KOMATSU, N. T.; SCOPEL, K. K. G.; BRAGA, E. M.; CAVASINI, C. E.; CORDEIRO, J. A.; FERREIRA, M. U. Epidemiology and control of frontier malaria in Brazil: lessons from community-based studies in rural Amazonia. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v. 104, n. 5, p. 343–350, 2010. DOI: 10.1016/j.trstmh.2009.12.010.

DANIELS, J.; POURMAND, N. Label-free impedance biosensors: opportunities and challenges. Electroanalysis, v. 19, n. 12, p. 1239–1257, 2007. DOI: 10.1002/elan.200603855.

DE MORAES, M. O. Desenvolvimento e caracterização de imunossensor eletroquímico dara detecção de câncer de tireoide diferenciado. Tese de doutorado, Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Brasil, 2019.

DE SOUZA CASTILHO, M.; LAUBE, T.; YAMANAKA, H.; ALEGRET, S.; PIVIDORI, M. I. Magneto immunoassays for *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2 related to malaria based on magnetic nanoparticles. Analytical Chemistry, v. 83, n. 14, p. 5570–5577, 2011. DOI: 10.1021/ac200573s.

DEANE, L. M. Os grandes marcos na história do controle da malária. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 25, n. Suppl II, p. 12–22, 1992.

DESHMUKH, K.; AHAMED, M. B.; DESHMUKH, R. R.; PASHA, S. K. K.; BHAGAT, P. R.; CHIDAMBARAM, K. Biopolymer composites with high dielectric performance: interface engineering. *In*: SADASIVUNI, K; CABIBIHAN, J. J.; PONNAMMA, D.; ALMAADEED, M. A.; JAEHWAN, K. (Eds.). Biopolymer composites in electronics. 1 ed. Elsevier Inc, p. 27–128. 2017. DOI: 10.1016/B978-0-12-809261-3/00003-6.

DI CARLO, G.; TRANI, A.; ZANE, D.; INGO, G. M.; PASQUALI, M.; DELL'ERA, A.; CURULLI, A. Influence of different biological environments on serotonin (5-HT) electrochemical behavior at gold screen printed electrodes. Electroanalysis, v. 26, n. 6, p.

1409–1418, 2014. DOI: 10.1002/elan.201400051.

DI GIOSIA, M.; VALLE, F.; CANTELLI, A.; BOTTONI, A.; ZERBETTO, F.; FASOLI, E.; CALVARESI, M. Identification and preparation of stable water dispersions of protein - carbon nanotube hybrids and efficient design of new functional materials. Carbon, v. 147, p. 70–82, 2019. DOI: 10.1016/j.carbon.2019.02.043.

DIP GANDARILLA, A. M.; REGIART, M.; BERTOTTI, M.; CORREA GLÓRIA, J.; MORAIS MARIUBA, L. A.; RICARDO BRITO, W. One-step enzyme-free dual electrochemical immunosensor for histidine-rich protein 2 determination. Royal Society of Chemistry Advances, v. 11, p. 408–415, 2021a. DOI: 10.1039/d0ra08729g.

DIP GANDARILLA, A. M.; ORELLANA CARLOS, J.; BRITO, W.; SANTOS, C.; MELONI, G.; BERTOTTI, M.; GLÓRIA, J.; MARIÚBA, L.A. Aplicação de nanotubos de carbono modificados com anti-*Pf*HRP2 no desenvolvimento de Imunossensor eletroquímico para a detecção da malária. *In*: ANDRADE, D.F. (Eds.). Ciências dos materiais: pesquisas e desenvolvimento no âmbito da UFAM. 1 ed. Belo Horizonte, Editora Poisson, p. 113–130, 2021b. DOI: 10.36229/978-65-5866-135-1.

DUBAL, D.P.; LEE, S.H.; KIM, J.G.; KIM, W.B.; LOKHANDE, C.D. Porous polypyrrole clusters prepared by electropolymerization for a high performance supercapacitor. Journal of Material Chemistry, v.7, p. 3044–3052, 2012. DOI: 10.1039/c2jm14470k.

DUTTA, G. Electrochemical biosensors for rapid detection of malaria. Materials Science for Energy Technologies, v. 3, p. 150–158, 2020. DOI: 10.1016/j.mset.2019.10.003.

DUTTA, G.; NAGARAJAN, S.; LAPIDUS, L. J.; LILLEHOJ, P. B. Enzyme-free electrochemical immunosensor based on methylene blue and the electro-oxidation of hydrazine on Pt nanoparticles. Biosensors and Bioelectronics, v. 92, p. 372–377, 2017. DOI: 10.1016/j.bios.2016.10.094.

DZIĄBOWSKA, K.; CZACZYK, E.; NIDZWORSKI, D. Application of electrochemical methods in biosensing technologies. *In*: RINKEN, T.; KIVIRAND, K. (Eds.). Biosensing technologies for the detection of pathogens - A prospective way for rapid analysis. IntechOpen, p. 151–171, 2017.DOI: 10.5772/intechopen.72175.

FARIAS, T. L. Desenvolvimento e caracterização de membranas de poli(ε-caprolactona) eletrofiadas e modificadas com heparina e ácidos graxos essenciais para aplicação biomédica. Dissertação de mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Brasil, 2021.

FELIXA, F. S.; ANGNES, L. Electrochemical immunosensors – A powerful tool for analytical applications. Biosensors and Bioelectronics, v. 102, p. 470–478, 2018. DOI: 10.1016/j.bios.2017.11.029.

FIGUEIREDO, A.; VIEIRA, N. C. S.; DOS SANTOS, J. F.; JANEGITZ, B. C.; AOKI, S. M.; JUNIOR, P. P.; LOVATO, R. L.; NOGUEIRA, M. L.; ZUCOLOTTO, V.; GUIMARÃES, F. E. G. Electrical detection of dengue biomarker using egg yolk immunoglobulin as the biological recognition element. Scientific Reports, v. 5, n. 7865, p. 1–5, 2015. DOI: 10.1038/srep07865.

FIGUEROA-MIRANDA, G.; FENG, L.; SHIU, S. C. C.; DIRKZWAGER, R. M.; CHEUNG, Y. W.; TANNER, J. A.; SCHÖNING, M. J.; OFFENHÄUSSER, A.; MAYER, D. Aptamer-based electrochemical biosensor for highly sensitive and selective malaria

detection with adjustable dynamic response range and reusability. Sensors and Actuators, B: Chemical, v. 255, p. 235–243, 2018. DOI: 10.1016/j.snb.2017.07.117.

FRADEN, J. Handbook of modern sensors. Physics, designs, and applications. 4ta Ed. New York, Springer, 2010. DOI: 10.1007/978-1-4419-6466-3.

GAMA, R. Controle do comportamento hidrofílico/hidrofóbico de polímeros naturais biodegradáveis através da decoração de superfícies com nano e microcomponentes. Tese de doutorado, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Brasil, 2014.

GAMRY INSTRUMENTS. Basics of electrochemical impedance spectroscopy, 2010. Disponível em <https://www.gamry.com/assets/Uploads/BasicsOfEIS.pdf >, acessado em 28 de agosto de 2020.

GANDHI, S.; CAPLASH, N.; SHARMA, P.; RAMAN SURI, C. Strip-based immunochromatographic assay using specific egg yolk antibodies for rapid detection of morphine in urine samples. Biosensors and Bioelectronics, v. 25, n. 2, p. 502–505, 2009. DOI: 10.1016/j.bios.2009.07.018.

GHAYOUR, Z.; OORMAZDI, H.; AKHLAGHI, L. Detection of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* DNA in human saliva and urine: loop-mediated isothermal amplification for malaria diagnosis. Acta Tropica, v. 136, p. 44–49, 2014. DOI: 10.1016/j.actatropica.2014.03.029.

GHINDILIS, A. L.; ATANASOV, P.; WILKINS, M.; WILKINS, E. Immunosensors: electrochemical sensing and other engineering approaches. Biosensors and Bioelectronics, v. 13, n. 1, p. 113–131, 1998. DOI: 10.1016/S0956-5663(97)00031-6.

GLORIA, J.; BRITO, W.; GANDARILLA, A.; LARRUDE, D.; CARLOS, J.; ARAUJO, F.; ALMEIDA, M. E.; MANZATO, L.; MARIUBA, L. A. Solubilization, characterization, and protein coupling analysis to multiwalled carbon nanotubes. High Performance Polymers, v. 33, n. 3, p. 338–344, 2020. DOI: 10.1177/0954008320958035.

GOGIA, S.; BALARAM, H.; PURANIK, M. Hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase distorts the purine ring of nucleotide substrates and perturbs the pKa of bound xanthosine monophosphate. Biochemistry, v. 50, n. 19, p. 4184–4193, 2011. DOI: 10.1021/bi102039b.

GOMES, R. S.; MOREIRA, F. T. C.; FERNANDES, R.; GORETI SALES, M. F. Sensing CA 15-3 in point-of-care by electropolymerizing o-phenylenediamine (oPDA) on Au-screen printed electrodes. Plos One, v. 13, n. 5, p. 1–19, 2018. DOI: 10.1371/journal.pone.0196656.

GOPINATH, S. C. B.; TANG, T. H.; CITARTAN, M.; CHEN, Y. Current aspects in immunosensors. Biosensors and Bioelectronic, v. 57, p. 292–302, 2014. DOI: 10.1016/j.bios.2014.02.029.

GRIESHABER, D.; MACKENZIE1, R.; VOROS, J.; REIMHULT, E. Electrochemical biosensors– Sensor principles and architectures. Sensors, v. 8, n. 3 p. 1400–1458, 2008. DOI: 10.3390/s80314000.

GROSSI, M.; RICCÒ, B. Electrical impedance spectroscopy (EIS) for biological analysis and food characterization: a review. Journal of Sensors and Sensor Systems, v. 6, p. 303–325, 2017. DOI: 10.1016/j.corsci.2008.08.049.

GUERRERO, S.; AGÜÍ, L.; YÁÑEZ-SEDEÑO, P.; PINGARRÓN, J. M. Oxidative grafting

vs. monolayers self-assembling on gold surface for the preparation of electrochemical immunosensors. Application to the determination of peptide YY. Talanta, v. 193, p. 139–145, 2019. DOI: 10.1016/j.talanta.2018.09.089.

GUY, R.; LIU, P.; PENNEFATHER, P.; CRANDALL, I. The use of fluorescence enhancement to improve the microscopic diagnosis of *falciparum* malaria. Malaria Journal, v. 6, n. 89, p. 1–8, 2007. DOI: 10.1186/1475-2875-6-89.

HASSANI, S.; REZAEI AKMAL, M.; SALEK-MAGHSOUDI, A.; RAHMANI, S.; REZA GANJALI, M.; NOROUZI, P.; ABDOLLAHI, M. Novel label-free electrochemical aptasensor for determination of diazinon using gold nanoparticles-modified screen-printed gold electrode. Biosensors and Bioelectronics, v. 120, p. 122–128, 2018. DOI: 10.1016/j.bios.2018.08.041.

HATHIWALA, R.; MEHTA, P. R.; NATARAJ, G.; HATHIWALA, S. LED fluorescence microscopy: Novel method for malaria diagnosis compared with routine methods. Journal of Infection and Public Health, v. 10, n. 6, p. 824–828, 2017. DOI: 10.1016/j.jiph.2017.01.001.

HEMBEN, A.; ASHLEY, J.; TOTHILL, I. E. An immunosensor for parasite lactate dehydrogenase detection as a malaria biomarker– Comparison with commercial test kit. Talanta, v. 187, p. 321–329, 2018. DOI: 10.1016/j.talanta.2018.04.086.

HEMBEN, A.; ASHLEY, J.; TOTHILL, I. E. Development of an immunosensor for *Pf* HRP 2 as a biomarker for malaria detection. Biosensors, v. 7, n. 3, p. 28, 2017. DOI: 10.3390/bios7030028.

HEMPELMANN, E. Hemozoin Biocrystallization in *Plasmodium falciparum* and the antimalarial activity of crystallization inhibitors. Parasitology Research, v. 100, n. 4, p. 671–676, 2007. DOI: 10.1007/s00436-006-0313-x.

HENDRIKSEN, I. C. E.; WHITE, L. J.; VEENEMANS, J.; MTOVE, G.; WOODROW, C.; AMOS, B.; SAIWAEW, S.; GESASE, S.; NADJM, B.; SILAMUT, K.; JOSEPH, S.; CHOTIVANICH, K.; DAY, N. P. J.; VON SEIDLEIN, L.; VERHOEF, H.; REYBURN, H.; WHITE, N. J.; DONDORP, A. M. Defining *falciparum*-malaria-attributable severe febrile illness in moderate-to-high transmission settings on the basis of plasma *Pf*HRP2 concentration. Journal of Infectious Diseases, v. 207, n. 2, p. 351–361, 2013. DOI: 10.1093/infdis/jis675.

HULKA, B. Overview of biological markers. *In*: HULKA B. S, GRIFFITH J. D., WILCOSKY, T. C. (eds.). Biological markers in epidemiology. New York, Oxford University Press, 1990.

IBÁÑEZ-REDÍN, G.; ALMEIDA SILVA, T.; CAMPANHÃ VICENTINI, F.; FATIBELLO-FILHO, O. Effect of carbon black functionalization on the analytical performance of a tyrosinase biosensor based on glassy carbon electrode modified with dihexadecylphosphate film. Enzyme and Microbial Technology, v. 116, p. 41–47, 2018. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2018.05.007.

ITO, R. M.; SOUZA, C. C.; DIP GANDARILLA, A. M.; OLIVEIRA, L. M.; BRITO W. R.; SANCHES, E. A.; MATOS, R. S.; DA FONSECA-FILHO, H. D. Micromorphology and microtexture evaluation of poly(o-ethoxyaniline) films using atomic force microscopy and fractal analysis. Journal of Polymer Research, v. 299, n. 27, p. 1–13, 2020. DOI: 10.1007/s10965-020-02262-7.

JAIN, P.; CHAKMA, B.; PATRA, S.; GOSWAMI, P. Potential biomarkers and their applications for rapid and reliable detection of malaria. BioMed Research International, v. 2014, p. 1–20, 2014. DOI: 10.1155/2014/852645.

JAIN, R.; JADON, N.; PAWAIYA, A. Polypyrrole based next generation electrochemical sensors and biosensors: a review. Trends in Analytical Chemistry, v. 97, p. 363–373, 2017. DOI: 10.1016/j.trac.2017.10.009.

JANEGITZ, B. C.; BACCARIN, M.; RAYMUNDO-PEREIRA, P. A.; DOS SANTOS, F. A.; OLIVEIRA, G. G.; MACHADO, S. A. S.; LANZA, M. R. V.; FATIBELLO-FILHO, O.; ZUCOLOTTO, V. The use of dihexadecylphosphate in sensing and biosensing. Sensors and Actuators, B: Chemical, v. 220, p. 805–813, 2015. DOI: 10.1016/j.snb.2015.06.020.

JANG, I. K.; DAS, S.; BARNEY, R. S.; PECK, R. B.; RASHID, A.; PROUX, S.; ARINAITWE, E.; REK, J.; MURPHY, M.; BOWERS, K.; BOADI, S.; WATSON, J.; NOSTEN, F.; GREENHOUSE, B.; CHIODINI, P. L.; DOMINGO, G. J. A new highly sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2 in whole blood. Malaria Journal, v. 17, n. 403, p. 1–8, 2018. DOI: 10.1186/s12936-018-2545-5.

JAROCKA, U.; GÓRA-SOCHACKA, A.; SIRKO, A.; ZAGÓRSKI-OSTOJA, W.; RADECKI, J.; RADECKA, H. Electrochemical immunosensor for detection of antibodies against in fl uenza A virus H5N1 in hen serum. Biosensors and Bioelectronics, v. 55, p. 301–306, 2014. DOI: 10.1016/j.bios.2013.12.030.

JUNG, Y.; JEONG, J. Y.; CHUNG, B. H. Recent advances in immobilization methods of antibodies on solid supports. Analyst, v. 133, p. 697–701, 2008. DOI: 10.1039/b800014j.

KATTENBERG, J. H.; OCHODO, E. A.; BOER, K. R.; SCHALLIG, H. D.; MENS, P. F.; LEEFLANG, M. M. Systematic review and meta-analysis: rapid diagnostic tests *versus* placental histology, microscopy and PCR for malaria in pregnant women. Malaria Journal, v. 10, p. 1–18, 2011. DOI: 10.1186/1475-2875-10-321.

KEISER, J.; UTZINGER, J.; PREMJI, Z.; YAMAGATA, Y.; SINGER, B. H. Acridine Orange for malaria diagnosis: its diagnostic performance, its promotion and implementation in Tanzania, and the implications for malaria control. Annals of Tropical Medicine and Parasitology, v. 96, n. 7, p. 643–654, 2002. DOI: 10.1179/000349802125001834.

KERSTING, S.; RAUSCH, V.; BIER, F. F.; NICKISCH-ROSENEGK, M. VON. Rapid detection of *Plasmodium falciparum* with isothermal recombinase polymerase amplification and lateral flow analysis. Malaria Journal, v. 13, p. 1–9, 2014. DOI: 10.1186/1475-2875-13-99.

KHODER, R.; KORRI-YOUSSOUFI, H. E-DNA biosensors of *M . tuberculosis* based on nanostructured polypyrrole. Materials Science & Engineering C, v. 108, p. 1–12, 2020. DOI: 10.1016/j.msec.2019.110371.

KHODZHAEVA, N. M.; BARANOVA, A. M.; TOKMALAEV, A. K. The immunological *Plasmodium falciparum* malaria characteristics of children in Tajikistan Republic. Journal of Tropical Medicine, v. 2019, p. 1–6, 2019. DOI: 10.1155/2019/5147252.

KIFUDE, C. M.; RAJASEKARIAH, H. G.; SULLIVAN, D. J.; STEWART, V. A.; ANGOV, E.; MARTIN, S. K.; DIGGS, C. L.; WAITUMBI, J. N. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2 in

blood, plasma, and serum. Clinical and Vaccine Immunology, v. 15, n. 6, p. 1012–1018, 2008. DOI: 10.1128/CVI.00385-07.

KIM, S.; JANG, L. K.; PARK, H. S.; LEE, J. Y. Electrochemical deposition of conductive and adhesive polypyrrole-dopamine films. Scientific Reports, v. 6, p. 1–8, 2016. DOI: 10.1038/srep30475.

KO, K. Y.; AHN, D. U. Preparation of immunoglobulin Y from egg yolk using ammonium sulfate precipitation and ion exchange chromatography. Poultry Science, v. 86, p. 400–407, 2007. DOI: 10.1093A/ps/86.2.400.

KORI, L. D.; VALECHA, N.; ANVIKAR, A. R. Glutamate dehydrogenase: a novel candidate to diagnose *Plasmodium falciparum* through rapid diagnostic test in blood specimen from fever patients. Scientific Reports, v. 10, n. 1, p. 1–7, 2020. DOI: 10.1038/s41598-020-62850-x.

KRAUSE, R. G. E.; GROBLER, A. F.; GOLDRING, J. P. D. Comparing antibody responses in chickens against *Plasmodium falciparum* lactate dehydrogenase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase with freunds and pheroid adjuvants. Immunological Investigations, v. 44, n. 7, p. 627–642, 2015. DOI: 10.3109/08820139.2015.1070268.

LANZARINI, N. M.; BENTES, G. A.; VOLOTÃO, E. DE M.; PINTO, M. A. Use of chicken immunoglobulin Y in general virology. Journal of Immunoassay and Immunochemistry, v. 39, n. 3, p. 235–248, 2018. DOI: 10.1080/15321819.2018.1500375.

LASIA, A. Electrochemical impedance spectroscopy and its applications. New York, Springer, 2014. DOI: 10.1007/978-1-4614-8933-7.

LEE, W. S.; KANG, T.; KWAK, K. J.; PARK, K.; YI, S. Y.; LEE, U. J.; SHIN, Y. B.; JEONG, J. Simple, rapid, and accurate malaria diagnostic platform using microfluidic-based immunoassay of *Plasmodium falciparum* lactate dehydrogenase. Nano Convergence, v. 7, n. 13, p. 1–8, 2020. DOI: 10.1186/s40580-020-00223-w.

LENZ, D.; KREMSNER, P. G.; LELL, B.; BIALLAS, B.; BOETTCHER, M.; MORDMÜLLER, B.; ADEGNIKA, A. A. Assessment of LED fluorescence microscopy for the diagnosis of *Plasmodium falciparum* infections in Gabon. Malaria Journal, v.10, n. 194, p. 1–6, 2011. DOI: 10.1186/1475-2875-10-194.

LI, C.; BAI, H.; SHI, G. Conducting polymer nanomaterials: electrosynthesis and applications. Chemical Society Reviews, v. 38, p. 2397–2409, 2009. DOI: 10.1039/b816681c.

LIM, S. A.; AHMED, M. U. Electrochemical immunosensors and their recent nanomaterial-based signal amplification strategies: a review. Royal Society of Chemistry Advances, v. 6, p. 24995–25014, 2016. DOI: 10.1039/c6ra00333h.

LIU, Y.; YU, J. Oriented immobilization of proteins on solid supports for use in biosensors and biochips: a review. Microchimica Acta, v.183, p. 1–19, 2016. DOI: 10.1007/s00604-015-1623-4.

LOW, Y. K.; CHAN, J.; SORAYA, G. V; BU, C.; ABEYRATHNE, C. D.; HUYNH, D. H.; SKAFIDAS, E.; KWAN, P. Development of an ultrasensitive impedimetric immunosensor platform for detection of *Plasmodium* lactate dehydrogenase. Sensors, v. 19, n. 11, p. 2446, 2019. DOI: 10.3390/s19112446.

MANGUIN, S.; BANGS, M. J.; POTHIKASIKORN, J.; CHAREONVIRIYAPHAP, T.

Review on global co-transmission of human *Plasmodium* species and wuchereria bancrofti by *Anopheles* mosquitoes. Infection, Genetics and Evolution, v. 10, n. 2, p. 159–177, 2010. DOI: 10.1016/j.meegid.2009.11.014.

MARIUBA, L. A.; ALMEIDA, M. E. M.; CHAVES, Y.; GLÓRIA, J. C.; NOGUEIRA, P. A.; ORLANDI, P. P.; OLIVEIRAA, L. .; SANTOS, F. A.; MANZATO, L.; BRITO, W.; ÁVILA, R. A. M.; DIP GANDARILLA, A. M. Métodos de solubilização de nanotubos de carbono, de ativação dos nanotubos de carbono de múltiplas paredes solubilizados, e, seus usos. Pedido nacional de invenção, BR1020180719335, Brasil, 2018.

MATHEMA, V. B.; NA-BANGCHANG, K. A brief review on biomarkers and proteomic approach for malaria research. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, v. 8, n. 4, p. 253–262, 2015. DOI: 10.1016/S1995-7645(14)60327-8.

MEDEIROS DE ASSIS, I. Desenvolvimento de sensores eletroquímicos para qualificação de óleos de copaíba. Tese de doutorado, Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Brasil, 2019.

MIELOCH, A. A.; KRĘCISZ, M.; RYBKA, J. D.; STRUGAŁA, A.; KRUPIŃSKI, M.; URBANOWICZ, A.; MACIEJ, K.; SKALSKI, B.; FIGLEROWICZ, M.; GIERSIGURBANOWICZ, M. The influence of ligand charge and length on the assembly of brome mosaic virus derived virus-like particles with magnetic core. AIP Advances, v. 8, 2018. DOI: 10.1063/1.5011138.

MINISTERIO DA SAÚDE. Guia de vigilância em saúde, 2017. Disponível em <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_saude_unificado.pdf> acessado em setembro de 2020.

MINISTERIO DA SAÚDE. Guia de tratamento da malária no Brasil, 2020. Disponível em <http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/doc/malaria/ms2020_malaria-guia-tto-2ed-27ago20-isbn.pdf> acessado em setembro de 2020.

MISTRY, K. K.; LAYEK, K.; MAHAPATRA, A.; ROYCHAUDHURI, C.; SAHA, H. A review on amperometric-type immunosensors based on screen-printed electrodes. Analyst, v. 139, n. 10, p. 2289–2311, 2014. DOI: 10.1039/c3an02050a.

MOHAMAD, R.; MARZUKI, H.; BUANG, A.; HUYOP, F.; WAHAB, R. A. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. Biotechnology & Biotechnological Equipment, v. 29, n. 2, p. 205–220, 2015. DOI: 10.1080/13102818.2015.1008192.

MOLLARASOULI, F.; KURBANOGLU, S.; OZKAN, S. A. The role of electrochemical immunosensors in clinical analysis. Biosensors, v. 9, n. 3, p. 1–19, 2019. DOI: 10.3390/bios9030086.

MOODY, A. Rapid diagnostic tests for malaria. Clinical Microbiology Reviews, v. 15, n. 1, p. 66–78, 2002. DOI: 10.1128/CMR.15.1.66–78.2002.

MORALES, M. A.; HALPERN, J. M. Guide to selecting a biorecognition element for Biosensors. Bioconjugate Chemistry, v. 29, n. 10, p. 3231–3239, 2019. DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.8b00592.Guide.

MOREIRA, F. T. C.; DUTRA, R. A. F.; NORONHA, J. P. C.; FERNANDES, J. C. S.; SALES, M. G. F. Novel biosensing device for point-of-care applications with plastic

antibodies grown on Au-screen printed electrodes. Sensors and Actuators, B: Chemical, v. 182, p. 733–740, 2013. DOI: 10.1016/j.snb.2013.03.099.

MOREIRA, F. T. C.; FERREIRA, M. J. M. S.; PUGA, J. R. T.; SALES, M. G. F. Screen-printed electrode produced by printed-circuit board technology. Application to cancer biomarker detection by means of plastic antibody as sensing material. Sensors & Actuators: B. Chemical, v. 223, p. 927–935, 2016. DOI: 10.1016/j.snb.2015.09.157.

MOUATCHO, J. C.; DEAN GOLDRING, J. P. Malaria rapid diagnostic tests: challenges and prospects. Journal of Medical Microbiology, v. 62, n. parte10, p. 1491–1505, 2013. DOI: 10.1099/jmm.0.052506-0.

MUELLER, I.; GALINSKI, M. R.; BAIRD, J. K.; CARLTON, J. M.; KOCHAR, D. K.; ALONSO, P. L.; DEL PORTILLO, H. A. Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. The Lancet Infectious Diseases, v. 9, n. 9, p. 555–566, 2009. DOI: 10.1016/S1473-3099(09)70177-X.

MUKRY, S. N.; SAUD, M.; SUFAIDA, G.; SHAIKH, K.; NAZ, A.; SHAMSI, T. S. Laboratory diagnosis of malaria: comparison of manual and automated diagnostic tests. Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology, v. 2017, n. 928639, p. 1–7, 2017. DOI: 10.1155/2017/9286392.

MUNHOZ, L. S.; VARGAS, G. D. Á.; FISCHER, G.; LIMA, M. DE; ESTEVES, P. A.; ḤBNER, S. DE O. Avian IgY antibodies: characteristics and applications in immunodiagnostic. Ciência Rural, v. 44, n. 1, p. 153–160, 2014. DOI: 10.1590/S0103-84782014000100025.

NAGARAJU, K.; REDDY, R.; REDDY, N. A review on protein functionalized carbon nanotubes. Journal of Applied Biomaterials and Functional Materials, v. 13, n. 4, p. e301–e312, 2015. DOI: 10.5301/jabfm.5000231.

NAVEEN, M. H.; GURUDATT, N. G.; SHIM, Y.-B. Applications of conducting polymer composites to electrochemical sensors: a review. Applied Materials Today, v. 9, p. 419–433, 2017. DOI: 10.1016/j.apmt.2017.09.001.

NAYLOR, S. Biomarkers: current perspectives and future prospects. Expert Review of Molecular Diagnostics, v. 3, n. 5, p. 525–529, 2003. DOI: 10.1586/14737159.3.5.525.

NEZAKATI, T.; SEIFALIAN, A.; TAN, A.; SEIFALIAN, A. M. Conductive polymers: opportunities and challenges in biomedical applications. Chemical Reviews, v. 118, p. 6766–6843, 2018. DOI: 10.1021/acs.chemrev.6b00275.

OLIVEIRA-FERREIRA, J.; LACERDA, M. V. G.; BRASIL, P.; LADISLAU, J. L. B.; TAUIL, P. L.; DANIEL-RIBEIRO, C. T. Malaria in Brazil: an overview. Malaria Journal, v. 9, n. 1, p. 1–15, 2010. DOI: 10.1186/1475-2875-9-115.

ORELLANA CARLOS, J. Imunossensores amperométricos label-free para a detecção de biomarcadores da Malária. Dissertação de mestrado, Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Brasil, 2017.

OUERGHI, O.; DIOUANI, M. F.; BELKACEM, A.; ELSANOUSI, A.; JAFFREZIC-RENAULT, N. Adjunction of avidin to a cysteamine self-assembled monolayer for impedimetric immunosensor. Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology, v. 7, p. 1–12, 2016. DOI: 10.4236/jbnb.2016.71001.

PARKASH, O.; YEAN, C. Y.; SHUEB, R. H. Screen printed carbon electrode based

electrochemical immunosensor for the detection of dengue NS1 antigen. Diagnostics, v. 4, n. 4, p. 165–180, 2014. DOI: 10.3390/diagnostics4040165.

PAUL, K. .; PANIGRAHI, A. K.; SINGH, V.; SINGH, S. G. A multi-walled carbon nanotube-zinc oxide nanofiber based flexible chemiresistive biosensor for malaria biomarker detection. Analyst, v. 142, n. 12, p. 2128–2135, 2017. DOI: 10.1039/c7an00243b.

PAUL, K. B.; KUMAR, S.; TRIPATHY, S.; VANJARI, S. R. K.; SINGH, V.; SINGH, S. A highly sensitive self assembled monolayer modified copper doped zinc oxide nanofiber interface for detection of *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein-2: targeted towards rapid, early diagnosis of malaria. Biosensors and Bioelectronics, v. 80, p. 39–46, 2016. DOI: 10.1016/j.bios.2016.01.036.

PIMENTA-MARTINS, M. G. R.; FURTADO, R. F.; HENEINE, L. G. D.; DIAS, R. S.; BORGES, M. F.; ALVES, C. R. Development of an amperometric immunosensor for detection of staphylococcal enterotoxin type A in cheese. Journal of Microbiological Methods, v. 91, p. 138–143, 2012. DOI: 10.1016/j.mimet.2012.05.016.

RAGAVAN, K.; KUMAR, S.; SWARAJ, S.; NEETHIRAJAN, S. Advances in biosensors and optical assays for diagnosis and detection of malaria. Biosensors and Bioelectronics, v. 105, p. 188–210, 2018. DOI: 10.1016/j.bios.2018.01.037.

RAMAN, J.; ASHOK, C. S.; SUBBAYYA, S. I. N.; ANAND, R. P.; SELVI, S. T.; BALARAM, H. *Plasmodium falciparum* hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase: stability studies on the product-activated enzyme. FEBS Journal, v. 272, n. 8, p. 1900–1911, 2005. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2005.04620.x.

RAMOS-JESUS, J.; CARVALHO, K. A.; FONSECA, R. A. S.; OLIVEIRA, G. G. S.; MELO, S. M. B.; ALCÂNTARA-NEVES, N. M.; DUTRA, R. F. A piezoelectric immunosensor for *Leishmania chagasi* antibodies in canine serum. Analytical and Bioanalytical Chemistry, v. 401, n. 3, p. 917–925, 2011. DOI: 10.1007/s00216-011-5136-7.

RANDVIIR, E. P.; BANKS, C. E. Electrochemical impedance spectroscopy: an overview of bioanalytical applications. Analytical Methods, v. 5, p. 1098–1115, 2013. DOI: 10.1039/c3ay26476a.

RÉHAULT-GODBERT, S.; GUYOT, N. Vitellogenesis and yolk proteins, birds. *In*: SKINNER, M. (Eds.). Encyclopedia of Reproduction. 2 ed, vol. 6, p. 278–284. 2018. DOI: 10.1016/B978-0-12-809633-8.20568-2.

REZAEI, B.; IRANNEJAD, N. Electrochemical detection techniques in biosensor applications. Electrochemical Biosensors. Elsevier Inc, p. 11–43, 2019. DOI: 10.1016/B978-0-12-816491-4.00002-4.

RODRÍGUEZ-ACOSTA, A.; DOMÍNGUEZ, N.; AGUILAR, I.; GIRÓN, M. Characterization of *Plasmodium falciparum* glutamate dehydrogenase-soluble antigen. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v. 31, p. 1149–1155, 1998. DOI: 10.1590/S0100-879X1998000900008.

ROGIER, E.; PLUCINSKI, M.; LUCCHI, N.; MACE, K.; CHANG, M.; LEMOINE, J. F.; CANDRINHO, B.; COLBORN, J.; DIMBU, R.; FORTES, F.; UDHAYAKUMAR, V.; BARNWELL, J. Bead-based immunoassay allows subpicogram detection of histidine-rich protein 2 from *Plasmodium falciparum* & estimates reliability of malaria rapid diagnostic tests. Plos One, v. 12, n. 2, p. 1–16, 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0172139.

SADKI, S.; SCHOTTLAND, P.; BRODIE, N.; SABOURAUD, G. The mechanisms of pyrrole electropolymerization. Chemical Society Reviews, v. 29, p. 283–293, 2000. DOI: 10.1039/a807124a.

SAHA, B.; SONGE, P.; EVERS, T. H.; PRINS, M. W. J. The influence of covalent immobilization conditions on antibody accessibility on nanoparticles. Analyst, v.142, p. 4247– 4256, 2017. DOI: 10.1039/c7an01424d.

SALGADO, A. M. Desenvolvimento e aplicação de sensores e sistemas de monitoração de biomassa, etanol e de substrato por modelo. Tese de doutorado, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Brasil, 2001.

SANDFORD, C.; EDWARDS, M. A.; LI, M.; BARMAN, K.; SIGMAN, M. S.; MINTEER, S. D.; KLUNDER, K. J.; HICKEY, D. P.; WHITE, H. S. A synthetic chemist ' s guide to electroanalytical tools for studying reaction mechanisms. Chemical Science, v. 10, p. 6404–6422, 2019. DOI: 10.1039/c9sc01545k.

SASSOLAS, A.; BLUM, L. J.; LECA-BOUVIER, B. D. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. Biotechnology Advances, v. 30, n. 3, p. 489–511, 2012. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2011.09.003.

SCHNEIDER, E. L.; MARLETTA, M. A. Heme binding to the histidine-rich protein II from *Plasmodium falciparum*. Biochemistry, v. 44, n. 3, p. 979–986, 2005. DOI: 10.1021/bi048570p.

SCHROEDER, B.; XUAN, H. LE; VÖLZKE, J. L.; WELLER, M. G. Preactivation crosslinking– An efficient method for the oriented immobilization of antibodies. Methods and Protocols, v. 2, n. 35, p. 1–14, 2019. DOI: 10.3390/mps2020035.

SCOTT, K. Electrochemical principles and characterization of bioelectrochemical systems. Microbial electrochemical and fuel cells. Elsevier Ltd, p. 29–66, 2016. DOI: 10.1016/B978-1-78242-375-1.00002-2.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Descrição do processo de monitoramento dos testes de diagnóstico rápido de malária, Brasil, 2014 a 2016. Boletim Epidemiológico, 2019. Disponível em <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/abril/01/2018-066.pdf> Acessado em novembro de 2020.

ŠETKA, M.; CALAVIA, R.; VOJKŮVKA, L.; LLOBET, E.; DRBOHLAVOVÁ, J.; VALLEJOS, S. Raman and XPS studies of ammonia sensitive polypyrrole nanorods and nanoparticles. Scientific Reports, v. 9, n. 1, p. 1–10, 2019. DOI: 10.1038/s41598-019-44900-1.

SHARMA, M. K.; RAO, V. K.; MERWYN, S.; AGARWAL, G. S.; UPADHYAY, S.; VIJAYARAGHAVAN, R. A novel piezoelectric immunosensor for the detection of malarial *Plasmodium falciparum* histidine rich protein-2 antigen. Talanta, v. 85, p. 1812–1817, 2011. DOI: 10.1016/j.talanta.2011.07.008.

SHEN, M.; RUSLING, J.; DIXIT, C. K.; BIOLOGY, C. Site-selective orientated immobilization of antibodies and conjugates for immunodiagnostics development. Methods, v. 116, p. 95–111, 2017. DOI: 10.1016/j.ymeth.2016.11.010.Site-Selective.

SIMONETTI, A. B. The biology of malarial parasite in the mosquito– A review. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 91, n. 5, p. 519–541, 1996. DOI: 10.1590/S0074-

02761996000500001.

SINGH, M.; KAUR, N.; COMINI, E. The role of self-assembled monolayers in electronic devices. Journal of Materials Chemistry C, v. 8, n. 12, p. 3938–3955, 2020. DOI: 10.1039/d0tc00388c.

SINGH, R.; HONG, S.; JANG, J. Label-free detection of influenza viruses using a reduced graphene oxide-based electrochemical immunosensor integrated with a microfluidic platform. Scientific Reports, v. 7, p. 1–11, 2017. DOI: 10.1038/srep42771.

SIREESHA, M.; BABU, V. J.; KIRAN, A. S. K. A review on carbon nanotubes in biosensor devices and their applications in medicine. Nanocomposites, v. 4, n. 2, p. 36–57, 2018. DOI: 10.1080/20550324.2018.1478765.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; WEST, D. .; CROUCH, R. . Fundamentos de química analítica. 8 ed. Editora Thomson, 2006.

SONG, S.; XU, H.; FAN, C. Potential diagnostic applications of biosensors: current and future directions. International Journal of Nanomedicine, v. 1, n. 4, p. 433–440, 2006. DOI: 10.2147/nano.2006.1.4.433.

SOUSA, L. P.; MARIUBA, L. A. M.; HOLANDA, R. J.; PIMENTEL, J. P.; ALMEIDA, M. E. M.; CHAVES, Y. O.; BORGES, D.; LIMA, E.; CRAINEY, J. L.; ORLANDI, P. P.; LACERDA, M. V.; NOGUEIRA, P. A. A novel polyclonal antibody-based sandwich ELISA for detection of *Plasmodium vivax* developed from two lactate dehydrogenase protein segments. BMC Infectious Diseases, v. 14, n. 49, p. 1–8, 2014. DOI: 10.1186/1471-2334-14-49.

STEINBUCH, M.; AUDRAN, R. The isolation of IgG from mammalian sera with the aid of caprylic acid. Archives of Biochemistry and Biophysics, v. 134, n. 2, p. 279–284, 1969. DOI: 10.1016/0003-9861(69)90285-9.

STORM, J.; PERNER, J.; APARICIO, I.; PATZEWITZ, E.; OLSZEWSKI, K.; LLINAS, M.; ENGEL, P. C.; MÜLLER, S. *Plasmodium falciparum* glutamate dehydrogenase a is dispensable and not a drug target during erythrocytic development. Malaria Journal, v. 10, n.193, p. 1–12, 2011. DOI: 10.1186/1475-2875-10-193 .

TALAPKO, J.; ŠKRLEC, I.; ALEBIĆ, T.; JUKIĆ, M.; VČEV, A. Malaria: the past and the present. Microorganisms, v. 7, n. 6, 2019. DOI: 10.3390/microorganisms7060179.

TAN, S.; AHANA, A. Charles Laveran (1845-1922): nobel laureate pioneer of malaria. Singapore Medical Journal, v. 50, n. 7, p. 657–658, 2009. <http://smj.sma.org.sg/5007/5007ms1.pdf>.

TANG, X.; LIU, T.; LI, H.; YANG, D.; CHEN, L.; TANG, X. Notably enhanced thermoelectric properties of lamellar polypyrrole by doping with β-naphthalene sulfonic acid. Royal Society of Chemistry Advances, v. 7, n. 33, p. 20192–20200, 2017. DOI: 10.1039/c7ra02302b.

TANGPUKDEE, N.; DUANGDEE, C.; WILAIRATANA, P.; KRUDSOOD, S. Malaria diagnosis: a brief review. Korean Journal of Parasitology, v. 47, n. 2, p. 93–102, 2009. DOI: 10.3347/kjp.2009.47.2.93.

TERTIS, M.; CERNAT, A.; SUCIU, M.; SA, R.; CRISTEA, C. Poly- (pyrrole-3-carboxylic acid) based nanostructured platform for the detection of carcinoembryonic antigen. Electroanalysis, v. 30, p. 1100–1106, 2018. DOI: 10.1002/elan.201700803.

THIRUMALAI, D.; VISAGA AMBI, S.; VIEIRA-PIRES, R. S.; XIAOYING, Z.; SEKARAN, S.; KRISHNAN, U. Chicken egg yolk antibody (IgY) as diagnostics and therapeutics in parasitic infections– A review. International Journal of Biological Macromolecules, v. 136, p. 755–763, 2019. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.06.118.

TRUONG, L. T. N.; CHIKAE, M.; UKITA, Y.; TAKAMURA, Y. Labelless impedance immunosensor based on polypyrrole– pyrolecarboxylic acid copolymer for hCG detection. Talanta, v. 85, p. 2576–2580, 2011. DOI: 10.1016/j.talanta.2011.08.018.

TUBÍA, I.; PAREDES, J.; PÉREZ-LORENZO, E.; ARANA, S. Antibody biosensors for spoilage yeast detection based on impedance spectroscopy. Biosensors and Bioelectronics, v. 102, p. 432–438, 2018. DOI: 10.1016/j.bios.2017.11.057.

ULMAN, A. Formation and structure of self-assembled monolayers. Chemical Reviews, v. 96, n. 4, p. 1533–1554, 1996. DOI: 10.1021/cr9502357.

VERHEYEN, E.; SCHILLEMANS, J. P.; WIJK, M. VAN; DEMENIEX, M.; HENNINK, W. E.; NOSTRUM, C. F. VAN. Challenges for the effective molecular imprinting of proteins. Biomaterials, v. 32, n. 11, p. 3008–3020, 2011. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.01.007.

VICENTINI, F. C.; JANEGITZ, B. C.; BRETT, C. M. A.; FATIBELLO-FILHO, O. Tyrosinase biosensor based on a glassy carbon electrode modified with multi-walled carbon nanotubes and 1-butyl-3-methylimidazolium chloride within a dihexadecylphosphate film. Sensors and Actuators, B: Chemical, v. 188, p. 1101–1108, 2013. DOI: 10.1016/j.snb.2013.07.109.

WAGNER, J. T.; LÜDEMANN, H.; FÄRBER, P. M.; LOTTSPEICH, F.; KRAUTH-SIEGEL, R. L. Glutamate dehydrogenase, the marker protein of *Plasmodium falciparum* cloning, expression and characterization of the malarial enzyme. European Journal of Biochemistry, v. 258, p. 813–819, 1998. DOI: 10.1046/j.1432-1327.1998.2580813.x.

WANG, H.; LI, X.; MAO, K.; LI, Y.; DU, B.; ZHANG, Y.; WEI, Q. Electrochemical immunosensor for a-fetoprotein detection using ferroferric oxide and horseradish peroxidase as signal amplification labels. Analytical Biochemistry, v. 465, p. 121–126, 2014. DOI: 10.1016/j.ab.2014.08.016.

WANG, J. Analytical electrochemistry. 3 ed. John Wiley & Sons. Inc, 2006. DOI: 10.1002 / 0471790303.

WANG, S.; DU, D. Studies on the electrochemical behaviour of hydroquinone at L-cysteine self-assembled monolayers modified gold electrode. Sensors, v. 2, n. 2, p. 41–49, 2002. DOI: 10.3390/s20200041.

WANG, Y.; LIU, A.; HAN, Y.; LI, T. Sensors based on conductive polymers and their composites: a review. Polymer International, v. 69, p. 7–17, 2020. DOI: 10.1002/pi.5907.

WARHURST, D. C.; WILLIAMS, J. E. Laboratory diagnosis of malaria. Journal of Clinical Pathology, v. 49, p. 533–538, 1996. https://jcp.bmj.com/content/jclinpath/49/7/533.full.pdf.

WELCH, N. G.; SCOBLE, J. A.; MUIR, B. W.; PIGRAM, P. J.; WELCH, N. G. Orientation and characterization of immobilized antibodies for improved immunoassays (Review). Biointerphases, v. 12, n. 2, p. 02D301– 02D301-13, 2017. DOI: 10.1116/1.4978435.

WHITE, N. J. Malaria parasite clearance. Malaria Journal, v. 16, n. 1, p. 1–14, 2017. DOI: 10.1186/s12936-017-1731-1.

WHITE, N. J.; PUKRITTAYAKAMEE, S.; HIEN, T. T.; FAIZ, M. A.; MOKUOLU, O. A.; DONDORP, A. M. Malaria. The Lancet, v. 383, n. 9918, p. 723–735, 2014. DOI: 10.1016/S0140-6736(13)60024-0.

WONGSRICHANALAI, C.; BARCUS, M. J.; MUTH, S.; SUTAMIHARDJA, A.; WERNSDORFER, W. H. A review of malaria diagnostic tools: microscopy and rapid diagnostic test (RDT). The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 77, p. 119–127, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines for the treatment of malaria. 3 ed, 2015a. Disponível em <https://apps.who.int/iris/handle/10665/162441> Acessado em 10 setembro de 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. How malaria RDTs work. 2015b. Disponível em <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/case-management/diagnosis/rapid-diagnostic-tests/how-malaria-rdts-work>. Acessado 10 novembro de 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Malaria. Nucleic acid amplification-based diagnostics. 2019. Disponível em <https://www.who.int/home/cms-decommissioning>. Acessado 26 outubro 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Parasitological confirmation of malaria diagnosis, 2010. Disponível em <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44323>. Acessado 26 outubro 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. World Malaria Report: 20 years of global progress and challenges, 2020. Disponível em <https://apps.who.int/iris/handle/10665/337660>. Acessado 26 outubro 2020.

WU, Y.; HU, S. The fabrication of a colloidal gold-carbon nanotubes composite film on a gold electrode and its application for the determination of cytochrome c. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, v. 41, n. 4, p. 299–304, 2005. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2004.12.019.

YU, J. Y.; JIAO, S. Q.; NAWAZ, T.; WANG, S. Q.; WEI, T. X. Surface plasmone resonance sensor for biomimetic detection of progesterone with macroporous molecularly imprinted polymers prepared by visible light. IOP Conference Series: Materials Science and Engineering , v. 688, n. 0330322019, 2019. DOI: 10.1088/1757-899X/688/3/033032.

YUAN, G.; HE, J.; LI, Y.; XU, W.; GAO, L.; YU, C. A novel ultrasensitive electrochemical immunosensor based on carboxy-endcapped conductive polypyrrole for the detection of gypican-3 in human serum. Analytical Methods, v. 7, p. 1745–1750, 2015. DOI: 10.1039/c4ay02820a.

ZHAO, X.; PAN, F.; GARCIA-GANCEDO, L.; FLEWITT, A. J.; ASHLEY, G. M.; LUO, J.; LU, J. R.; SHEFFIELD, S. Interfacial recognition of human prostate-specific antigen by immobilized monoclonal antibody: effects of solution conditions and surface chemistry. Journal of the Royal Society. Interface, v. 9, p. 2457–2467, 2012. DOI: 10.1098/rsif.2012.0148.

ANEXOS

Anexo 1. One-step enzyme-free dual electrochemical immunosensor for histidine-rich protein 2 determination.

RSC Advances

ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY

PAPER

View Article Online
View Journal | View Issue

Open Access Article. Published on 23 December 2020. Downloaded on 4/13/2021 8:29:54 PM.
This article is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported Licence.

Check for updates

Cite this: *RSC Adv.*, 2021, **11**, 408

One-step enzyme-free dual electrochemical immunosensor for histidine-rich protein 2 determination†

Ariamna María Dip Gandarilla,[a] Matias Regiart,[*b] Mauro Bertotti,[b] Juliane Correa Glória,[c] Luís André Morais Mariuba[c] and Walter Ricardo Brito[*a]

Received 13th October 2020
Accepted 9th December 2020

DOI: 10.1039/d0ra08729g

rsc.li/rsc-advances

In the present work, we describe a novel one-step enzyme-free dual electrochemical immunosensor for the determination of histidine-rich protein 2 (Ag-*Pf*HRP2), a specific malaria biomarker. A gold electrode (GE) was functionalized with the *Pf*HRP2 antibody (Ab-*Pf*HRP2) using dihexadecyl phosphate (DHP) polymer as an immobilization platform. The Ab-*Pf*HRP2/DHP/GE sensor was characterized by cyclic voltammetry, electrochemical impedance spectroscopy, Fourier-transform infrared spectroscopy, scanning electron microscopy, and atomic force microscopy. The developed immunosensor was employed for indirect Ag-*Pf*HRP2 determination by differential pulse voltammetry (DPV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS). The linear range was 10–400 ng mL^{-1} and 10–500 ng mL^{-1} for EIS and DPV, while the limit of detection was 3.3 ng mL^{-1} and 2.8 ng mL^{-1}, respectively. The electrochemical immunosensor was successfully applied for Ag-*Pf*HRP2 determination in human serum samples. Its performance was compared with an ELISA test, and good correspondence was achieved. The coefficients of intra- and inter-assay variations were less than 5%. The electrochemical immunosensor is a useful and straightforward tool for *in situ* malaria biomarker determination.

1. Introduction

Malaria is one of the most important tropical infectious parasitic diseases, caused by *Plasmodium* sp. parasites (*Plasmodium falciparum*, *ovale*, *vivax*, *malariae*, and *knowlesi*) and transmitted by the female of *Anopheles* mosquito. According to the World Malaria Report 2019, there was an estimate of 405 000 deaths globally in 2018, and the infections by *Plasmodium falciparum* parasite are the most common.[1] The morbidity and mortality are higher in low resource populations, with limited health care facilities.[2]

Malaria diagnosis is commonly confirmed by microscopic examination, which consists of the observation of blood samples on a microscopic slide assisted with staining. However, such an approach requires trained professionals, specialized facilities, long analysis time, expensive equipment, and reagents.[3] Nucleic acid amplification tests have also been used to detect the nucleic acid of the malaria parasite, including loop-mediated isothermal amplification, real-time quantitative polymerase chain reaction, and quantitative nucleic acid amplification techniques. However, they have many disadvantages, such as poor reproducibility at low concentrations, expensive and time-consuming, require good laboratory facilities, and skilled personnel.[4,5] Rapid diagnostic tests (RDTs) based on the *Plasmodium* biomarkers detection are another alternative and hold advantages, like the low cost, short analysis times, the possibility of *in situ* multiple species detection, and require unskilled labor.[6]

Biomarkers are molecular, biochemical, or cellular variations measurable in biological samples that indicate any biological, pathogenic, or therapeutic response.[7] Recent bibliography reported the development of several aptasensors and immunosensors for malaria based on biomarkers detection, like histidine-rich protein II (HRP-2),[8–10] lactate dehydrogenase (LDH),[11–13] aldolase (ALD),[14] hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT),[15] glutamate dehydrogenase (GluDH),[16] and products such as hemozoin.[17]

In the last years, nanotechnology advances allowed the integration of novel materials into bio-analytical detection systems based on recognition elements such as enzymes, antibodies, nucleic acids, among others.[18,19] These devices are characterized by simple, rapid, and accurate results due to the selective and sensitive interaction between bio-reagents and target analytes without the need to remove interferants from the sample before detection. The application of such devices is

[a]*Department of Chemistry, Federal University of Amazonas, Manaus, Amazonas 69067-005, Brazil. E-mail: wrbrito@ufam.edu.br; Tel: +55 92 981379920*

[b]*Department of Fundamental Chemistry, Institute of Chemistry, University of São Paulo, São Paulo 05508-000, Brazil. E-mail: matiasregiart@gmail.com; Tel: +55 11 982885489*

[c]*Leônidas and Maria Deane Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Manaus, Amazonas 69057-070, Brazil*

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/d0ra08729g

© 2021 The Author(s). Published by the Royal Society of Chemistry

Anexo 2. Ciência dos Materiais: Pesquisas e desenvolvimento no âmbito da UFAM. Capítulo 08. Aplicação de nanotubos de carbono modificados com anti-*Pf*HRP2 no desenvolvimento de imunossensor eletroquímico para a detecção da malária.

Editor Chefe: Dr. Darly Fernando Andrade

Conselho Editorial
Dr. Antônio Artur de Souza – Universidade Federal de Minas Gerais
Ms. Davilson Eduardo Andrade
Dra. Elizângela de Jesus Oliveira – Universidade Federal do Amazonas
MS. Fabiane dos Santos
Dr. José Eduardo Ferreira Lopes – Universidade Federal de Uberlândia
Dr. Otaviano Francisco Neves – Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais
Dr. Luiz Cláudio de Lima – Universidade FUMEC
Dr. Nelson Ferreira Filho – Faculdades Kennedy
Ms. Valdiney Alves de Oliveira – Universidade Federal de Uberlândia

Corpo Científico
M.Sc. Cinara da Silva Cardoso
M.Sc. Gerson de Mendoça Nogueira
D.Sc. Luciane Farias Ribas
M.Sc. Rejane Flores da Costa
D.Sc. Rute Holanda Lopes
M.Sc. Ana Rosa Cecílio
M.Sc. Wanilce do Socorro Pimente

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

E57
Ciência dos Materiais: Pesquisas e desenvolvimento no âmbito da UFAM/ Paulo Rogério da Costa Couceiro, Walter Ricardo Brito, Ygor Geann dos Santos Leite, Suelânia Cristina Gonzaga de Figueiredo – Organização Editora Poisson – Belo Horizonte – MG: Poisson, 2021

Formato: PDF
ISBN: 978-65-5866-135-1
DOI: 10.36229/978-65-5866-135-1

Modo de acesso: World Wide Web
Inclui bibliografia

1. Engenharia 2. Ciência dos Materiais. I. COUCEIRO, Paulo Rogério da Costa. II. BRITO, Walter Ricardo. III. LEITE, Ygor Geann dos Santos. IV. FIGUEIREDO, Suelânia Cristina Gonzaga de. I. Título.

CDD-620

Sônia Márcia Soares de Moura – CRB 6/1896

O conteúdo deste livro está licenciado sob a Licença de Atribuição Creative Commons 4.0.
Com ela é permitido compartilhar o livro, devendo ser dado o devido crédito, não podendo ser utilizado para fins comerciais e nem ser alterada.

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos seus respectivos autores.
Baixe outros títulos gratuitamente em www.poisson.com.br
contato@poisson.com.br

CAPÍTULO

08 Aplicação de nanotubos de carbono modificados com anti-*Pf*HRP2 no desenvolvimento de imunossensor eletroquímico para a detecção da malária

Ariamna M. Dip Gandarilla
Jacqueline M. Orellana
Carlos Walter Ricardo Brito

Departamento de Química, Universidade Federal do Amazonas - UFAM, 69067-005 Manaus, AM, Brasil.
E-mail: ariamna@ufam.edu.br

Carla Santana Santos
Gabriel Negrão Meloni
Mauro Bertotti

Departamento de Química Fundamental, Instituto de Química, Universidade de São Paulo - USP, 05508-000 São Paulo, SP, Brasil.

Juliane Corrêa Glória
Luis André Morais Mariúba

Instituto Leonidas e Maria Deanne, Fundação Oswaldo Cruz,69057-070 Manaus, AM, Brasil.

RESUMO

As infecções por malária afetam a população de muitos países do mundo, entre eles o Brasil, em que a doença representa um grave problema de saúde pública, especialmente na região amazônica. Atualmente, a procura por métodos simples, eficientes e de baixo custo para o diagnóstico da doença tem se intensificado, e o desenvolvimento de sistemas de detecção bioanalítica (biossensores) representa uma alternativa promissora. Alguns materiais, como os nanotubos de carbono (NTC), são aplicados na fabricação destes dispositivos, com objetivo de melhorar seu desempenho. No presente capítulo, é proposto o desenvolvimento de um imunossensor eletroquímico para a detecção da malária, o qual foi preparado por meio da imobilização de anticorpos (Anti-*Pf*HRP2) ancorados a NTC na superfície de um eletrodo impresso de ouro (SPGE), usando uma matriz polimérica de fosfato de dihexadecil (DHP). As diferentes etapas de fabricação do imunossensor foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura e técnicas eletroquímicas (voltametria cíclica, voltametria de pulso diferencial, espectroscopia de impedância eletroquímica e microscopia eletroquímica de varredura). As imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura mostraram

claras mudanças nas características morfológicas dos eletrodos limpos e modificados, confirmando a imobilização do material DHP/NTC na superfície do SPGE. Os resultados dos experimentos eletroquímicos revelaram que o eletrodo SPGE/DHP/Anti-*Pf*HRP2-NTC apresentou variação significativa e satisfatória nas propriedades de interface, como maiores valores de corrente e menor resistência à transferência de carga (Rct). O imunossensor eletroquímico foi aplicado para a detecção de *Pf*HRP2 (biomarcador específico da malária) e observou-se a esperada passivação do eletrodo (diminuição de corrente e incremento da Rct) após o período de incubação em solução de antígeno.

Palavras chave: Imunossensor eletroquímico; Malária; Anticorpos-Nanotubos de carbono.

APPLICATION OF CARBON NANOTUBES-ANTI-*Pf*HRP2 IN THE DEVELOPMENT OF AN ELECTROCHEMICAL IMMUNOSENSOR FOR MALARIA DETECTION

ABSTRACT

Malaria is one of the most important infectious diseases that affect many countries globally, including Brazil, where it represents a serious public health problem, especially in the Amazon region. There is an increasing effort towards the development of simple, efficient, and low-cost methods for malaria diagnosis and a promising alternative is the development of bioanalytical detection systems (biosensors). Some materials, such as carbon nanotubes (CNT), are commonly used to manufacture these devices and improve their performance. In the present chapter, we propose the development of an electrochemical immunosensor for malaria detection, which was prepared by immobilizing *Pf*HRP2 antibodies coupled to CNT onto the surface of screen-printed gold electrodes (SPGE), using dihexadecyl phosphate (DHP) as a polymeric matrix. The different stages of the immunosensor fabrication were characterized by scanning electron microscopy (SEM) and electrochemical techniques (cyclic voltammetry, differential pulse voltammetry, electrochemical impedance spectroscopy, and scanning electrochemical microscopy). The SEM images confirm the DHP/CNT immobilization onto the SPGE surface, which is evidenced by clear changes in the morphological features of bare and modified electrodes. The results of the electrochemical experiments revealed significant and satisfactory changes in the interface properties of the SPGE/DHP/Anti-*Pf*HRP2-CNT sensor, such as higher current values and lower charge transfer resistance (Rct). The electrochemical immunosensor was used to detect *Pf*HRP2 (malaria biomarker), and, as expected, electrode passivation (current decrease and increase in Rct) was observed after incubation in an antigen solution.

Keywords: Electrochemical immunosensor, Malaria, Antibodies, Carbon nanotubes.