

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**FACULDADE DE MEDICINA**

**ESTUDO DAS INTERAÇÕES ENTRE PEPTÍDEOS, ELETRODOS  
IMPRESSOS E INDICADORES ELETROQUÍMICOS UTILIZANDO MÉTODOS  
VOLTAMÉTRICOS PARA DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSENSORES**

**FRANCIELLI CRISTINE CUNHA MELO**

**DOUTORADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**2019**

**FRANCIELLI CRISTINE CUNHA MELO**

**ESTUDO DAS INTERAÇÕES ENTRE PEPTÍDEOS, ELETRODOS  
IMPRESSOS E INDICADORES ELETROQUÍMICOS UTILIZANDO MÉTODOS  
VOLTAMÉTRICOS PARA DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSENSORES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Ciências da Saúde.

Orientador: Luiz Ricardo Goulart Filho

Co-orientador: Luciano Pereira Rodrigues

**UBERLÂNDIA**

**2019**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

M528e  
2019      Melo, Francielli Cristine Cunha, 1977  
            Estudo das interações entre peptídeos, eletrodos impressos e indicadores eletroquímicos utilizando métodos voltamétricos para desenvolvimento de imunossensores [recurso eletrônico] / Francielli Cristine Cunha Melo. - 2019.

Orientador: Luiz Ricardo Goulart Filho.

Coorientador: Luciano Pereira Rodrigues.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2019.1237>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Ciências médicas. 2. Peptídeos. 3. Eletrodos. 4. Doenças - Diagnóstico. I. Goulart Filho, Luiz Ricardo, 1962, (Orient.). II. Rodrigues, Luciano Pereira, 1976, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. IV. Título.

---

CDU: 61

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947

## DECLARAÇÃO

Processo nº 23117.012196/2019-91

Interessado: Luiz Ricardo Goulart Filho, MARÍLIA OLIVEIRA FONSECA GOULART, Eduardo Antônio Ferraz Coelho, Jair Pereira da Cunha Junior, Mário Machado Martins

Declaramos para os devidos fins que a Comissão Julgadora da Defesa de Tese de Doutorado da aluna **Francieli Cristine Cunha Melo**, do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, intitulada "**Desenvolvimento de imunossensores voltamétricos utilizando peptídeos miméticos de antígenos para diagnóstico de doenças negligenciadas.**"; realizada no dia 14 de março de 2019, na Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia, foi composta pelos seguintes professores:

### TITULARES:

Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho (Orientador) (UFU)

Profa. Dra. Marília Oliveira Fonseca Goulart (UFAL)

Prof. Dr. Eduardo Antônio Ferraz Coelho (UFMG)

Prof. Dr. Jair Pereira da Cunha Júnior (UFU)

Prof. Dr. Mário Machado Martins (UFU)

### Suplente:

Prof. Dr. Robinson Sabino da Silva (UFU)

Por ser verdade firmamos o presente.

ROBINSON SABINO DA SILVA

Coordenador do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde  
Portaria Rnº 1459/2017



Documento assinado eletronicamente por **Robinson Sabino da Silva, Coordenador(a)**, em 13/03/2019, às 18:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://www.sei.ufu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1085349** e o código CRC **8C54D7F7**.

À memória de Luiz Roberto da Silva Klassmann, quem tornou esse trabalho possível.

Ao Nupi, Meg, Lelé, Vivi e todos os animais e pessoas vítimas de doenças negligenciadas.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador e amigo **Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho**, pela dedicação, paciência nos momentos de dificuldade, competência, respeito e profissionalismo;

Ao Co-orientador **Prof. Dr. Luciano Pereira Rodrigues** pelo constante apoio, mesmo à distância;

Aos profissionais do Laboratório, técnicos e professores, agora grandes amigos, Natassia, Luciana, Fabiana e Robinson, por compartilharem comigo seus conhecimentos, essenciais à conclusão desse trabalho;

Aos meus amigos de pós-graduação pelo companheirismo nesses 4 anos;

À minha família pelo carinho, apoio, dedicação e paciência de sempre, em especial ao primo Helton (*in memoriam*) pela amizade incondicional. Aos meus filhos pelo amor, abraços e sorrisos em todas as horas. Ao meu esposo por acreditar em nossos sonhos nesses 20 anos, pelo amor, lealdade e respeito do dia a dia;

Aos meus colegas de serviço público, Rodrigo, Marcel, Dorivalda e Viviane, por me apoiarem neste desafio;

À Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, por investir no conhecimento de seus servidores como forma de promoção e proteção da saúde da população brasileira;

A todos que participaram e contribuíram de alguma maneira para a realização deste trabalho, meu sincero agradecimento.

*“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”. (Isaac Newton)*

## RESUMO

**Introdução.** O diagnóstico precoce de doenças é de fundamental importância para que as ações em saúde pública sejam efetivas no controle da incidência dessas doenças na população. Os atuais métodos, além de dispendiosos, não são capazes de atender áreas remotas ou sem estrutura laboratorial, tornando-se um empecilho à implementação de políticas de resposta rápida e abrangentes. Recentemente, diversos equipamentos vêm sendo miniaturizados, fornecendo alternativas portáteis para o desenvolvimento de testes diagnósticos na forma de biosensores. Dentre estes, os potenciostatos portáteis associados à tecnologia de eletrodos impressos se destacam por sua simplicidade operacional, baixo custo e diversidade de técnicas e materiais de base para os eletrodos disponíveis comercialmente. A funcionalização da superfície desses eletrodos com anticorpos ou antígenos, origina os imunossensores eletroquímicos, capazes de reconhecer seu alvo, nos mais diversos materiais biológicos. **Objetivos.** Estudar as interações superficiais entre o material do eletrodo e as biomoléculas e indicadores eletroquímicos, a fim de subsidiar teoricamente a construção de imunossensores eletroquímicos utilizando sondas peptídicas. **Material e métodos.** Em nosso estudo utilizamos peptídeos miméticos a antígenos de parasitas das doenças Leishmaniose Visceral, Leishmaniose Tegumentar Americana, Estrongiloidíase e Hanseníase, obtidos pelo método Phage Display, como sondas de reconhecimento das correspondentes IgGs em amostras de soro humano. Dois modelos de plataformas foram desenvolvidos baseados no estudo das afinidades entre esses peptídeos e o material de base dos eletrodos, sendo esses de ouro nanoporoso ou de grafite. **Resultados e conclusão.** Obtivemos sucesso na funcionalização fundamentada na ligação ouro-tiol (presente nos peptídeos) e nas interações grafite-peptídeos-pirazol, com sucesso na discriminação entre amostras positivas para as doenças estudadas e controles. Além disso, um indicador eletroquímico universal para sondas peptídicas foi proposto para utilização em eletrodos à base de carbono.

Palavras-chave: imunossensores, diagnóstico de doenças, eletrodos impressos, sondas peptídicas, 4-(dimetilamino) -1,5-dimetil-2-fenilpirazol-3-ona, indicador 4-dimetilaminoantipirina, aminofenazona.



## ABSTRACT

**Introduction.** The diseases premature diagnosis is of fundamental importance for the effectiveness of public health actions. Current laboratory methods, besides expensive, are not able to serve remotely or in laboratory-free areas. It creates the manly difficult to implement rapid and comprehensive response policies. Recently, several devices have been miniaturized, providing portable alternatives for the development of diagnostic tests in the form of biosensors. Among these, portable potentiostats associated with printed electrode technology stand out for their operational simplicity, low cost, and diversity of techniques and base materials for commercially available electrodes. The functionalization of these electrodes' surface with antibodies or antigens (natural or not), originates electrochemical immunoassays, able to recognize their target (antigen or antibody) in the most diverse biological materials. **Objective.** To study the surface interactions between electrode material, biomolecules and electrochemical indicators, to theoretically subsidize the construction of electrochemical immunoassay using peptide probes. **Material and methods.** In our study, we used mimetic peptides of parasite antigens from diseases Visceral Leishmaniasis, American Cutaneous Leishmaniasis, Strongyloidiasis, and Leprosy, obtained by the Phage Display method as probes for recognition of the corresponding IgGs in human serum samples. Two platforms were developed according to the study of the affinities between these peptides and the base material of the electrodes, gold or graphite. **Results and conclusion.** The results demonstrated success in the functionalization substantiated on gold-thiol bond and graphite-peptide-pyrazol interactions, with discrimination between samples positive for studied diseases and controls. In addition, a universal electrochemical indicator for peptide probes has been proposed for use in carbon-based electrodes.

**Keywords:** immunosensor, neglected diseases, screen-printed electrode, peptide probe, 4-Dimethylamino-1,5-dimethyl-2-phenyl-1,2-dihydro-3H-pyrazol-3-one (4,4-Dimethylaminophenazone), Aminophenazone indicator.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Casos confirmados de Leishmaniose Visceral (A) e Leishmaniose Tegumentar Americana (B), nos anos de 2016 e 2017, para todas as classificações epidemiológicas.

Figura 2. Número de óbitos em decorrência de Strongiloidíase no ano de 2017 por macrorregião brasileira. Fonte: Sistema de Informações sobre Mortalidade SIM/MS.

Figura 3. Dados absolutos de incidência e prevalência da Hanseníase por região brasileira no ano de 2018. Fonte: SINAN - Sistema de Informações de Agravos de Notificação e CGHDE - Coordenação Geral de Hanseníase e Doenças em Eliminação.

Figura 4. Tratamento de limpeza dos eletrodos previamente à etapa de linha de base e funcionalização da camada sensora: 5 scans de voltametria cíclica de eletrodo de ouro (220BT) em solução de ácido sulfúrico 0,5M.

Figura 5. Estrutura dos peptídeos mimotopos utilizados como sondas de reconhecimento de IgGs em nossos estudos. Produtos protegidos pelas patentes PI0903089-1A2 e BR102014003636-9.

Figura 6. Demonstração das interações entre o anel aromático das antipirinas e a superfície de grafite, e do pirazol com os aminoácidos.

### Artigo 1.

Fig. 1. Nano porous surface of work electrode. Agglomeration of gold particles from micrometric to nanometric leading to the formation of numerous pores and increasing the surface of the electrode (Scanning Electron Microscopy - Multiuser Microscopy Lab, Federal University of Uberlandia, Brazil).

Fig. 2. Differential Pulse Voltammetry (DPV): (A) C10 peptide, (B) D3 peptide, and (C) detergent phase with different pools of serum samples. Blue lines indicate positive serum for strongyloidiasis, red and green lines represent sera from negative and other parasitic diseases, respectively. Electrolytic solution [Fe (CN)<sub>6</sub>]<sup>4-</sup>/<sub>3-</sub> and KCl, electrode BT 220, scan rate= 15. 0mV.s<sup>-1</sup>.

Fig. 3. AFM topographical images of gold electrodes for detection of IgG with *Strongyloides stercoralis* antigens C10 (A, B, C), D3 (D, E, F), and Detergent Phase (G, H, I). Incubation with positive sera (A, D, G), negative sera (B, E, H), and sera from other parasitic diseases (C, F, I).

## Artigo 2.

Fig. 1. Scheme demonstrating the basic structure of antipyrine and its possible derivations (Source: Santos et al., 2010).

Fig. 2. DPV for the first three scans of the 4-DMAP (5 mmol.L<sup>-1</sup>) on the screen-printed graphite electrode C110 and gold electrode screen printed BT220 (A) in electrolyte phosphate buffer saline (pH 7.4); and cyclic voltammetry of target probe reaction LC1 Peptide - IgG anti L chagasi, on graphite electrode C110 and electrolyte [Fe (CN) 6] 4- / 3- and 0.1 M KCl, pH 7.0 (C): red - positive serum (standard deviation - SD = 2.5); blue - negative serum (SD = 1.2); green (out of graph) demonstrates the oxidation of the electrolyte, with no other components added.

Fig. 3. Electrochemical results of differential pulse voltammetry for Leishmaniasis detection using the LC1 peptide and 4-DMAP in two different moments of the functionalization of the electrodes' surfaces. A, A1 and A2 - functionalization using 4-DMAP before serum (AS); B, B1 and B2 - functionalization using 4-DMAP after serum (BS). Numbers on top of histogram boxes are standard deviation values. Electrolyte: phosphate buffer saline (pH 7.4).

Fig. 4. Imprisonment of 4-DMAP below the structure of IgGs immobilized in the antigen-antibody reaction by the addition of positive serum on the surface of the functionalized carbon electrode and stages of adsorption. The caption shows each component added to the system. Electrolyte: phosphate buffer saline (pH 7.4).

Fig. 5. Results of the differential pulse voltammetric readings using 4-DMAP before serum A and B - Strongyloidiasis probe D3 (1.0 mg / ml), C and D - tegumentary leishmaniasis probe LT (7.6 mg / ml), E and F - Leprosy probe M3R (3.53 µg / ml); blue = positive serum, yellow = negative serum, and green = controls - "OP" serum for other parasites and "Pr" probe. Average Standard Deviation = 1,3; 0,6; 0,5 (B); 0,3; 2,7; 2,1 (D); 2,5 and 1,2 (F) respectively. Graphs

showing current range -5 to 20  $\mu\text{A}$  and potential -0.2 to 0.9 V (same scale for all probes). Electrolyte: phosphate buffer saline (pH 7.4). The control was absent in F.

Fig. 6. Atomic force microscopy images (AFM) of the graphite electrode (C110) (A); 4-DMAP added to C110 (B); LC1 added to C110 followed by 4-DMAP (C); LC1 + 4-DMAP with positive IgG serum (D); LC1 + 4-DMAP with negative IgG serum (E).  $R_q$  equivalent to roughness values.

## LISTA DE TABELAS

### **Artigo 1.**

Table 1. Three antigens used for electrochemical detection, their reaction conditions, diagnostic parameters, and references.

Table 2. AFM analyses specified by the Roughness coefficient (Rq) for antigen binding to patients' sera (IgG) from *Strongyloides* positive, negative, and other parasitosis.

### **Artigo 2.**

Table 1. Target diseases, probes ID and concentrations, serum dilution, and specific references for each probe.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4-DMAP – 4-(dimetilamino) -1,5-dimetil-2-fenilpirazol-3-ona, 4-(dimetilamino) antipirina ou aminofenazona

4-MAP – 4-(metilamino) antipirina

4-AAP – 4-amino antipirina

BSA – Albumina Sérica Bovina

C10 – Peptídeo mimético de antígenos para Estrongiloidíase

D3 – Peptídeo mimético de antígenos para Estrongiloidíase

Dp – fase detergente (detergente phase)

ELISA – Ensaio de imunoabsorção enzimática

IgG – Imunoglobulina do tipo G

LC1 – Peptídeo mimético de antígenos para Leishmaniose Visceral

LT – Leishmaniose tegumentar americana

LT – Peptídeo mimético de antígenos para Leishmaniose Tegumentar

LV – Leishmaniose visceral

M3R – Peptídeo mimético de antígenos para Hanseníase

PCR – Reação de Cadeia Polimerase

RIFI – Reação de Imunofluorescência Indireta

RNA – Ácido Ribonucleico

SAMs - Self Assembled Monolayers

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....</b>	<b>18</b>
2.1 1. Panorama das Leishmanioses, Estrongiloidíase e Hanseníase.....	18
2.2 Contextualização dos sensores biológicos.....	23
2.3 A técnica de Phage Display.....	24
2.4 Imunossensores eletroquímicos .....	25
2.5 Interações superficiais em biossensores.....	27
2.6 Indicadores Eletroquímicos .....	35
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>37</b>
<b>4 ARTIGOS .....</b>	<b>38</b>
4.1 ARTIGO 1 - Biological determinants and their interface with nanoporous gold electrode as critical components of the electrochemical response in serological analysis.....	38
4.2 ARTIGO 2 - The redox property of 4-dimethylaminoantipyrine as a new electrochemical indicator for protein immunosensors.....	57
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>80</b>
<b>ANEXO 1 .....</b>	<b>86</b>
<b>ANEXO 2 .....</b>	<b>87</b>

## INTRODUÇÃO

Doenças tropicais negligenciadas são aquelas associadas a estados diversos de pobreza, condições sanitárias inadequadas e proximidade a agentes vetores que, devido à impossibilidade de ampla disseminação (por restrições ambientais de seu ciclo biológico) e pouca visibilidade das populações afetadas, não atraem a atenção dos países desenvolvidos e de grandes laboratórios de desenvolvimento de produtos farmacêuticos (WHO, 2010). Portanto, ocorrem prevalentemente em locais sem acesso à infraestrutura básica de distribuição de água potável, coleta de esgoto e lixo, e ampla proximidade a animais domésticos (ou aglomerações destes) sem cuidados básicos de saúde e higiene, como as periferias dos grandes centros urbanos e áreas rurais.

A Organização Mundial de Saúde aponta a intensificação da gestão de casos, que inclui o diagnóstico precoce, como uma das 5 estratégias de saúde pública para o controle dessas doenças. No Brasil, um país de dimensões continentais, a melhor gestão dos casos significa a necessidade de métodos de diagnóstico (ou de triagem de acometimento) que possam ser utilizados em regiões de poucos recursos laboratoriais, rápidos, portáteis e de baixo custo, de modo a construir cenários preditivos de expansão dessas doenças para melhor aplicação de políticas preventivas em saúde pública, como medicação preventiva e controle de vetores.

Esta gestão de casos, com ênfase no diagnóstico precoce para implementação de políticas de controle ambiental, de vetores e tratamento precoce para redução da incidência e prevalência, seria de grande valia para determinadas patologias ainda persistentes em nosso país, com destaque para os objetos de interesse desse estudo: as leishmanioses visceral e tegumentar, a estrangiloidíase e as hanseníases.

Nos últimos anos, os biossensores têm demonstrado ser um dos melhores sistemas de diagnóstico rápido, preciso e econômico para determinação de analitos em fluidos biológicos. O desenvolvimento de biossensores para diagnóstico de dengue, leishmaniose, doenças endêmicas, de surtos ou de semi-surtos epidêmicos trará forte impacto pelo fato desta tecnologia permitir que o diagnóstico seja realizado em áreas remotas, através da coleta de sangue de



polpa digital, repercutindo em maior vigilância e controle epidemiológico (Guedes, 2009).

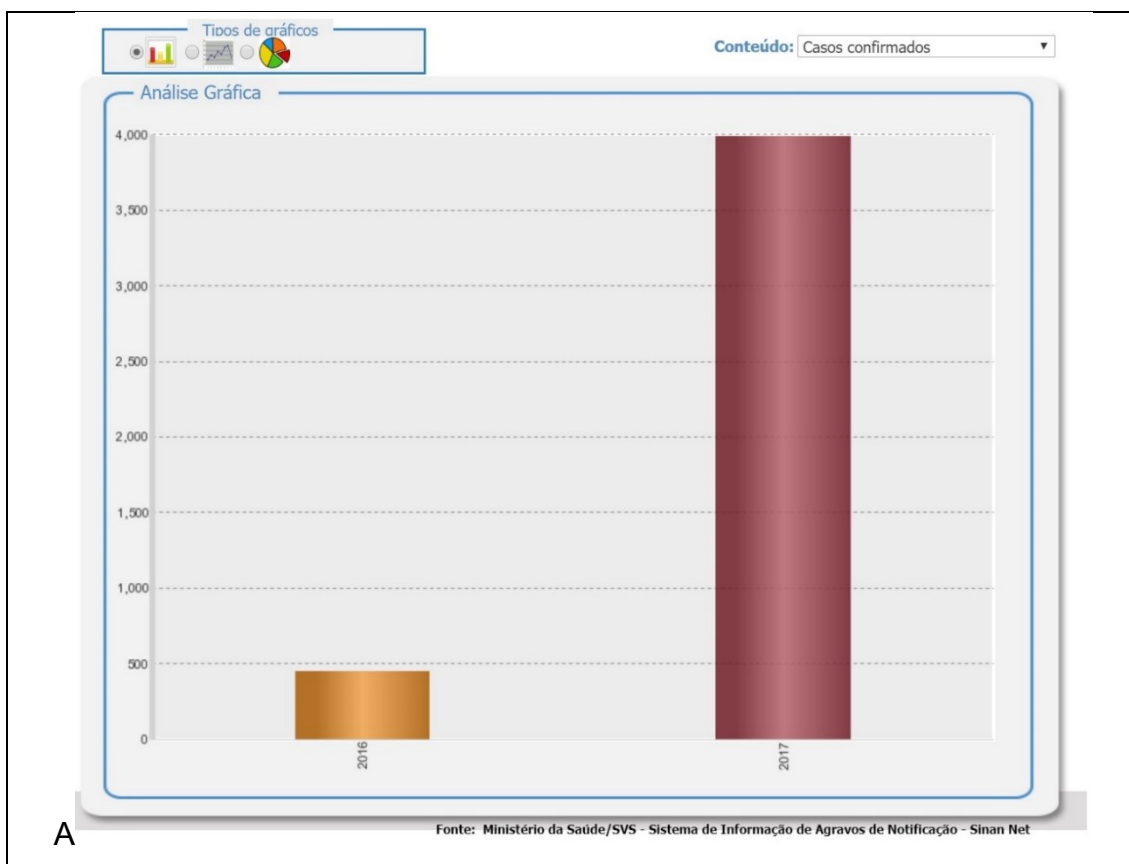
Um dos mecanismos mais comumente utilizados na construção de biossensores são os transdutores eletroquímicos. O princípio baseia-se nas propriedades elétricas dos eletrodos que são afetados, por exemplo, pela interação anticorpo-antígeno, no caso dos imunossensores, gerando um sinal mensurável correspondente a essa interação. A construção de um biossensor consiste na modificação de um transdutor com um material biológico que servirá como sonda para detecção da reação de sua ligação específica com o analito alvo. Esse processo consiste de uma transferência de sinal, para responder às mudanças eletroquímicas do receptor causadas pela ligação específica (Moyna e Ybarra, 2012).

Antígenos ou anticorpos podem ser utilizados para funcionalizar a camada sensora sendo adicionados sobre a superfície de um eletrodo que receberá corrente elétrica fixa ou variável. Em nosso trabalho estudamos as interações superficiais da camada sensora, composta por eletrodos de ouro nanoestruturado e de carbono grafite tipo screen-printed, através da imobilização de peptídeos miméticos de antígenos de Leishmaniose visceral, leishmaniose tegumentar, estrongiloidíase e hanseníase, previamente identificados pela técnica de *Phage Display*, de modo a contribuir para a elaboração de futuros sensores para detecção dessas doenças.

## FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 1. Panorama das Leishmanioses, Estrongiloidíase e Hanseníase

As leishmanioses encontram-se dentro da classe de doenças ditas negligenciadas e infecta cerca de 12 milhões de pessoas em 88 países, e o Brasil está entre os 6 países mais afetados, sendo que 90% dos casos de leishmaniose na América Latina ocorrem no Brasil. As leishmanioses vêm causando preocupação sanitária devido à ausência de drogas apropriadas para o tratamento e pela sua expansão geográfica associada à tendência de urbanização. (Academia Brasileira de Ciências, 2010). Na América Latina a Leishmaniose Visceral é causada pela *L. chagasi*, espécie considerada semelhante a *L. infantum* que ocorre na bacia do mediterrâneo, conforme mostrado recentemente por estudos bioquímicos e moleculares, e a Leishmaniose Tegumentar Americana por *L. brasiliensis*, *L. amazonenses*, entre outros. A figura 1 mostra os últimos dados disponíveis sobre a incidência dessas doenças (casos confirmados) de acordo com o banco de dados do Ministério da Saúde, demonstrando o aumento do número de casos novos no Brasil.



A

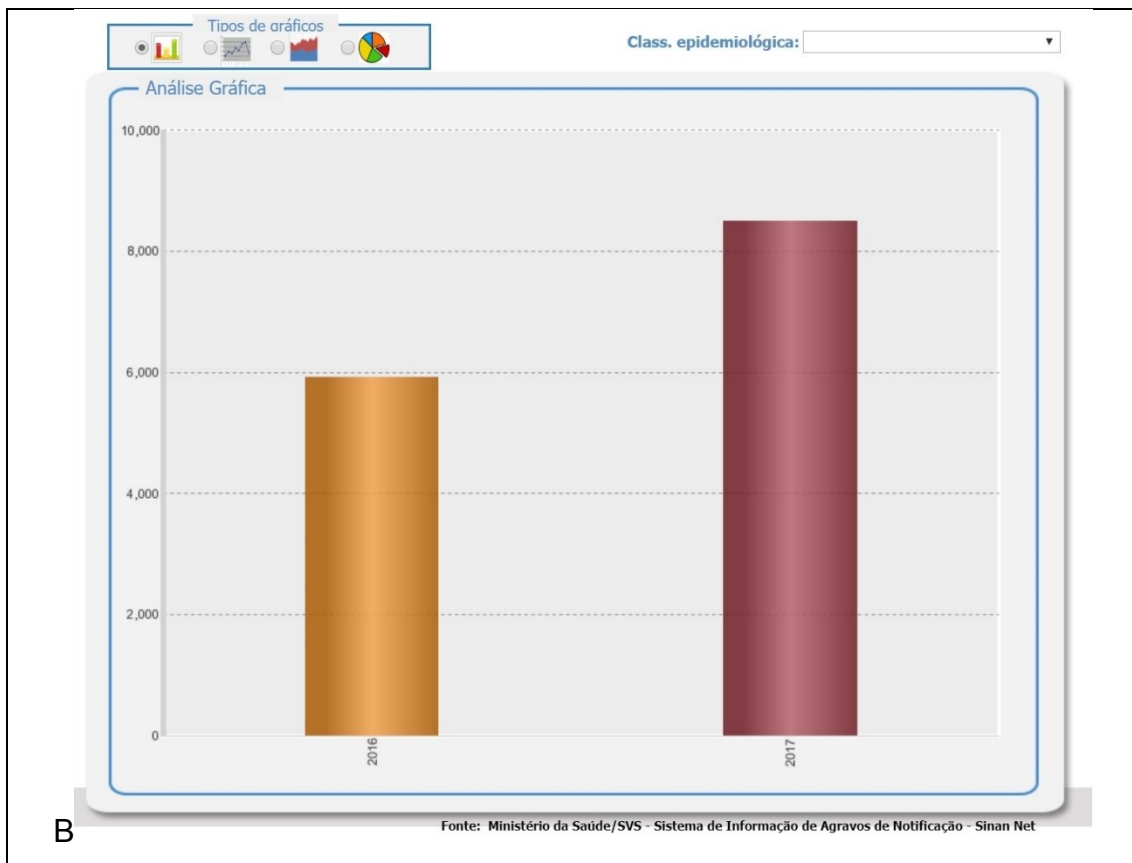


Figura 1. Casos confirmados de Leishmaniose Visceral (A) e Leishmaniose Tegumentar Americana (B), nos anos de 2016 (amarelo) e 2017 (vermelho), para todas as classificações epidemiológicas.

O protocolo de diagnóstico atual do Ministério da Saúde preconiza o exame parasitológico como padrão-ouro, com a identificação de formas amastigotas em órgãos do sistema retículo endotelial, e os testes imunoenzimáticos e RIFI (reação de imunofluorescência indireta) positiva >1:80, desde que sempre acompanhados de quadro clínico compatível e excluídos outros diagnósticos. Para casos assintomáticos provenientes de regiões endêmicas recomenda-se coleta de soro para os exames de RIFI e ELISA, além da intradermoreação de Montenegro (Tavora *et al.*, 2007; Ministério Da Saúde, 2014). Em cães os métodos diagnósticos são os mesmos utilizados em seres humanos, porém o uso isolado desses métodos não é aconselhado devido a reações cruzadas com outros agentes infecciosos caninos. Outros métodos como a Aglutinação Rápida (Fast Agglutination-Screening Test) e imunocromatografia vem sendo descritos como métodos promissores no diagnóstico da doença em cães (Leal, 2009). Porém, esses métodos necessitam de estrutura laboratorial complexa e não conseguem ser aplicados rapidamente

em áreas remotas, além de não conseguirem avaliar a exposição das pessoas ao vetor.

A Estrongiloidíase é uma parasitose intestinal de grande importância epidemiológica global, afetando de 30 a 600 milhões de pessoas. No Brasil, sua prevalência é uma das mais altas dentre as doenças parasitárias. Possui uma grande capacidade de disseminação devido ao fato de produzir pouquíssimos ou nenhum sintoma enquanto se replica. Há associação com diversas doenças imunossupressoras, e nesses casos oferece grande risco à vida dessas pessoas. A prevalência desta doença aumentou em até 50% em regiões de solo úmido e disposição impropria de resíduos humanos, como em algumas regiões tropicais, por exemplo Brasil, Caribe e Sul da Ásia, tendo visto que uma das fases do ciclo de vida do parasita ocorre no solo (Buonfrate *et al.*, 2013; Requena-Méndez, 2013; Puthiyakunnon *et al.*, 2014; Varatharajalu e Kakuturu, 2016). Acredita-se que o uso de corticosteroides é capaz de aumentar o número de mudas do parasita por se assemelhar à hidroxiecdisona, responsável pelo processo de ecdise (Keiser e Nutman, 2004; Sudré *et al.*, 2006; De Bona e Basso, 2008).

O diagnóstico se baseia no exame parasitológico de amostras de fezes, escarro ou lavado gástrico, simples ou múltiplas, por meio do Baermann-Moraes. Outros testes que podem ser usados para auxiliar o diagnóstico em casos graves são: reação de imunofluorescência indireta (RIFI), ELISA e hemoaglutinação (Ministério da Saúde, 2010). O aprimoramento desses testes vem sendo pesquisado para melhoria de sua sensibilidade e especificidade na detecção da doença. Como exemplo podemos citar as novas proteínas recombinantes para uso em ELISA, Teste de Aglutinação baseado em Microscopia de Imunofluorescência Indireta, Análise Imunoblot e o teste de PCR em tempo real para busca de gene de RNA de uma subunidade ribossômica do parasita nas fezes para detecção de casos; enquanto isso, os testes de rotina exibem baixa sensibilidade de detecção (Sudré *et al.* 2006; Requena-Méndez, 2013; Buonfrate *et al.*, 2015; Varatharajalu e Kakuturu, 2016).

A figura 2 mostra os óbitos por região no ano de 2017 no Brasil. Não foi possível obter dados recentes de gastos específicos com saúde pública voltados especificamente à estrongiloidíase.

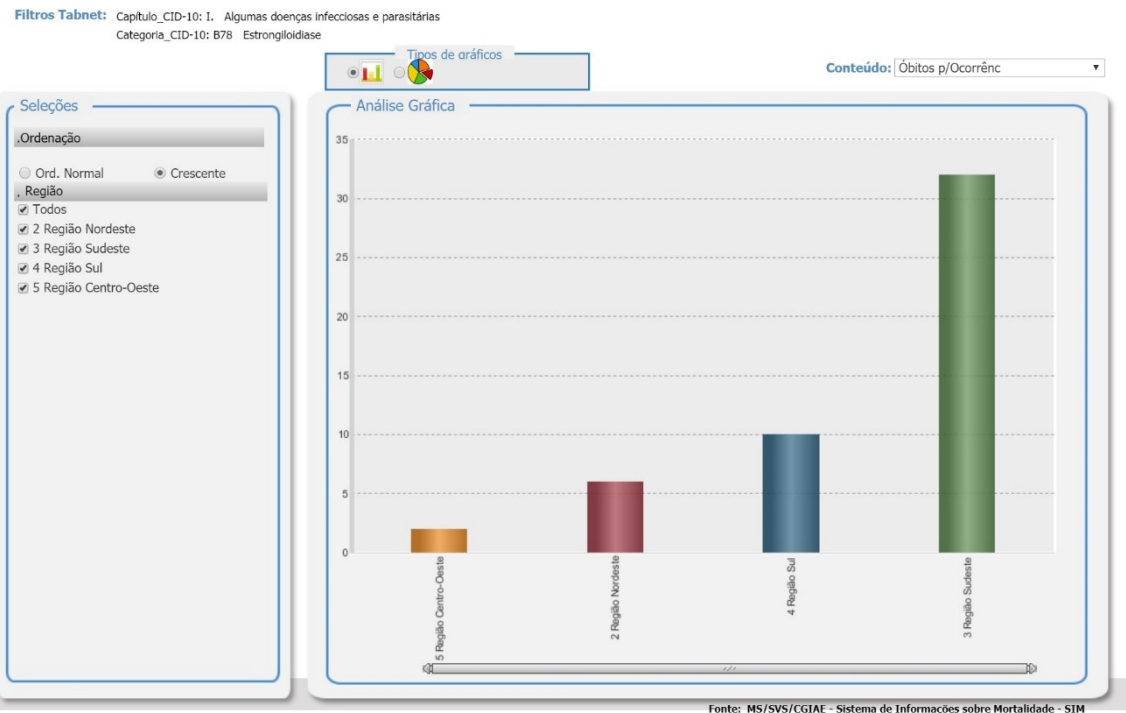


Figura 2. Número de óbitos em decorrência de Strongiloidíase no ano de 2017 por macrorregião brasileira. Fonte: Sistema de Informações sobre Mortalidade SIM/MS.

Hanseníase é uma doença causada pela bactéria *Mycobacterium leprae*, atingindo pele, olhos, trato respiratório superior e nervos periféricos, sendo de progressão lenta e com formas altamente infectantes. Está associada a habitações precárias, estado nutricional ruim e baixa escolaridade, que se associam indiretamente a condições de higiene que favorecem o contágio e desenvolvimento da doença (IPEA, 2011). O pico de incidência da doença no Brasil nos últimos vinte anos se deu em 2003, com mais de 60.000 novos casos notificados. Desde então, a doença vem diminuindo substantivamente. Porém, apenas 3 países, dentre os 122 endêmicos, permanecem nessa categoria segundo a OMS, sendo o Brasil um deles, com mais de 2 casos notificados a cada 10 mil habitantes. Em 2015 a taxa de prevalência da doença no Brasil foi a menor registrada desde 2004, com 1,01 casos/10 mil habitantes, porém essa tendência de diminuição não foi observada em todas as regiões do país, com Nordeste, Norte e Centro-Oeste superando e média nacional (Ribeiro *et al.*, 2018). A figura 3 mostra os dados de incidência e prevalência da Hanseníase no ano de 2018.

Os gastos com a hanseníase giram em torno de US\$ 76 a US\$ 264 conforme estimativa da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2010) e incluem medicamentos para tratamento, profissionais, devido ao diagnóstico predominantemente clínico, reabilitação e prevenção de incapacidades, além dos custos indiretos, pois a doença atinge pessoas em idade economicamente ativa. O principal tratamento disponível é por administração de antibióticos múltiplos, mas o diagnóstico precoce é importante para evitar as deformidades resultantes da infecção. O diagnóstico da hanseníase é clínico, podendo ser auxiliado principalmente por baciloscopia de raspado intradérmico ou exame histopatológico, sempre associados à clínica (Ministério da Saúde, 2017). Não existe, atualmente um teste rápido disponível para detecção da hanseníase.

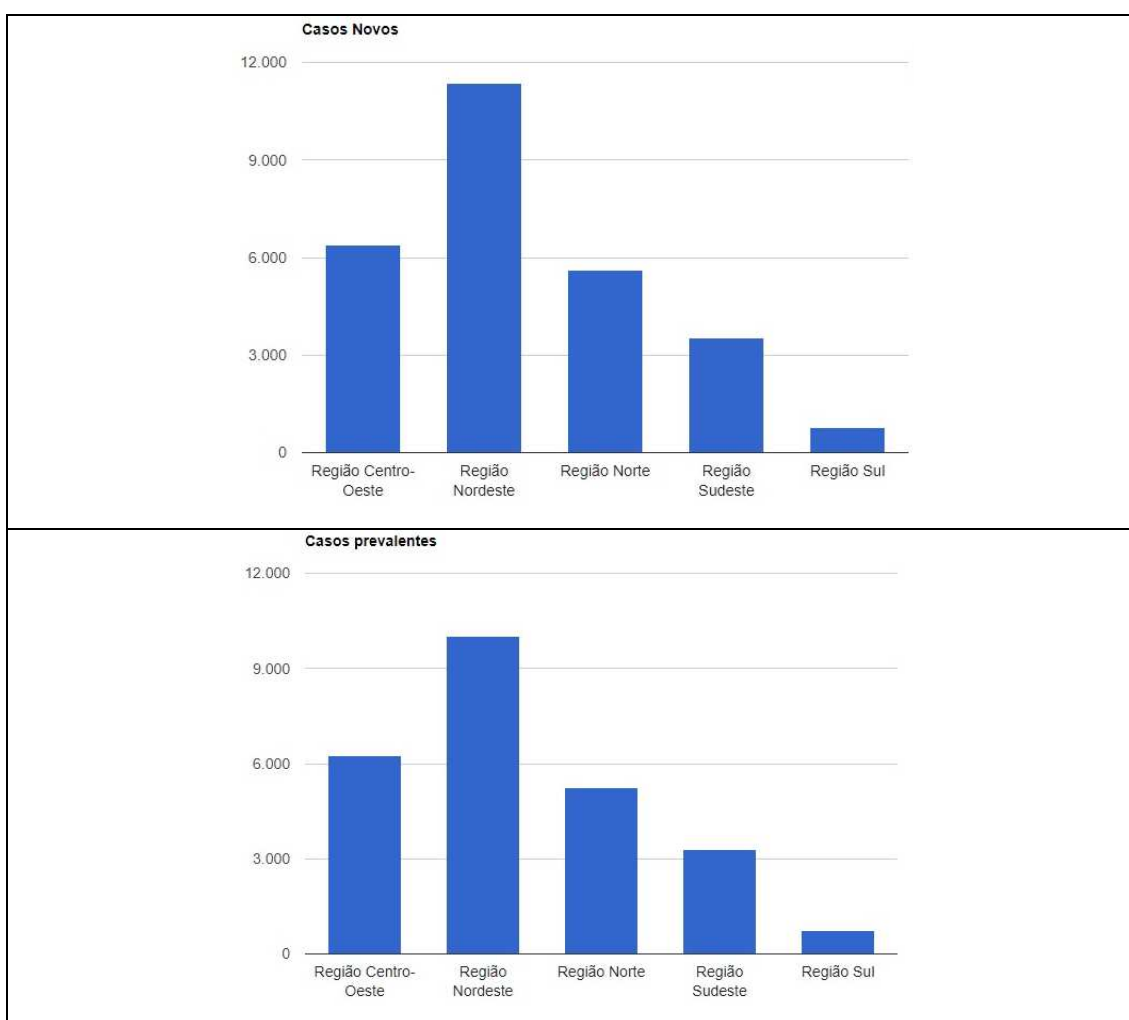


Figura 3. Dados absolutos de incidência e prevalência da Hanseníase por região brasileira no ano de 2018. Fonte: SINAN - Sistema de Informações de Agravos de Notificação e CGHDE - Coordenação Geral de Hanseníase e Doenças em Eliminação.

Diante desses fatores, é evidente a importância do desenvolvimento de método diagnóstico sensível, específico, rápido e de fácil uso em campo para o diagnóstico precoce de doenças negligenciadas em regiões endêmicas e de expansão dessas doenças, para que políticas públicas de controle e tratamento precoce sejam estabelecidas com base em dados concretos, evitando esforços e gastos públicos desnecessários nesta temática.

## **2. Contextualização dos Sensores biológicos**

Em saúde pública, sistemas de diagnóstico e monitoramento em tempo real são altamente vantajosos tendo em vista a necessidade de identificação precoce de doentes para adoção de medidas de controle, mas esbarram na complexidade dos procedimentos realizados, indisponibilidade de laboratórios de suporte e demora na conclusão dos testes. Essa problemática é ainda mais evidente quando tratamos de doenças que ocorrem em locais de difícil acesso, regiões remotas, na maioria das vezes sem suporte de saúde, saneamento e educação preventiva.

Nesse cenário, o desenvolvimento de sistemas menos complexos de diagnóstico, sistemas portáteis e rápidos, são de grande valia na construção de programas de saúde pública. Mesmo que o teste diagnóstico não seja mais sensível ou específico que o respectivo teste laboratorial padrão ouro, ele oferece uma importante ferramenta na triagem de casos suspeitos.

Partindo dessa premissa, os sensores biológicos ou biossensores são uma alternativa interessante aos diagnósticos complexos, devido ao grande número de equipamentos e métodos disponíveis comercialmente para seu desenvolvimento. Os sensores biológicos possuem diversas naturezas, eletroquímica, ótica, magnética, dentre outras associadas ao transdutor, mas podem ser também imunológicos, genéticos, enzimáticos, etc., quando se observa a camada sensora, elemento principal no desenvolvimento de um biossensor (Santana *et al.*, 2017).

Dentre os diversos tipos de sensores biológicos, os imunossensores são aqueles capazes de transformar a reação antígeno-anticorpo em sinal através de um transdutor. Neste sistema, a sonda de reconhecimento pode ser tanto um anticorpo quanto um antígeno, dependendo do desenho do estudo.

Particularmente, as sondas de antígenos podem ser obtidas por extração e purificação de parasitas, células e outros materiais biológicos ou não, ou por técnicas de síntese laboratorial, como Phage Display, que possibilita a construção de sondas para alvos específicos, com base na identificação de epítomos ou determinantes antigênicos, regiões de reconhecimento do antígeno pelos anticorpos (Almeida *et al.*, 2015).

### **3. A técnica de Phage Display**

O Phage Display é uma técnica de clonagem que consiste na inserção de sequências gênicas de interesse em uma região codificadora de um bacteriófago utilizado como agente vetor da sequência de interesse ao interior das células de bactérias onde são expressas. A técnica foi descrita pela primeira vez em 1985 por George P. Smith, que demonstrou a exibição de peptídeos em fagos filamentosos. Esses peptídeos quando ligados ao alvo de interesse poderiam ser selecionados de acordo com sua afinidade por este alvo (Wu *et al.*, 2016).

Bibliotecas de fagos expressando peptídeos são usadas para a seleção de sequências de aminoácidos que imitam, ou mimetizam, determinados epítomos proteicos reconhecidos por anticorpos naturais, e são chamados mimotopos. Apesar de possuírem baixa similaridade com os antígenos primários, esses peptídeos geram respostas imunes muito semelhantes (Wu *et al.*, 2016) e devido a esta característica possuem ainda diversas funcionalidades, desde o tratamento de doenças (Ladner *et al.*, 2004; Muteeb *et al.*, 2017), até o diagnóstico e desenvolvimento de vacinas (Schmitz *et al.*, 2000; Cardoso *et al.*, 2009; Ferraz Coelho *et al.*, 2015; Rami *et al.*, 2017).

Para formação das bibliotecas de fagos, uma grande variabilidade de sequências gênicas codificadoras de peptídeos ou proteínas são inseridas no DNA de bacteriófagos ligadas a regiões codificadoras de proteínas do capsídeo viral, sendo, portanto, expressos em sua superfície. Estes fagos são apresentados às moléculas alvo para que ocorra uma seleção por afinidade, chamada *Biopanning*. Estando os alvos fixados em uma superfície, sucessivas lavagens são responsáveis por retirar todos os fagos inespecíficos ou com ligações fracas ao alvo. Como resultado tem-se fagos expressando peptídeos específicos ligados ao alvo fixo. Os fagos, separados do alvo por tampões



ácidos, são então colocados em cultura bacteriana para amplificação dos peptídeos de interesse em ciclos sucessivos de seleção (Hoogenboom *et al.*, 1998; Hoogenboom e Chames, 2000; Schmitz *et al.*, 2000; Ferraz Coelho *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2016).

O Inovírus M13 é o mais utilizado atualmente nesta técnica e possui um capsídeo composto por 5 proteínas diferentes, sendo as proteínas pIII e pVIII escolhidas preferencialmente na apresentação de sequências de interesse (Cortese *et al.*, 1994). Apenas a pIII é capaz de apresentar grandes sequências de aminoácidos sem comprometer sua função celular. As bactérias infectadas pelo M13 de bibliotecas adquirem a coloração azul, o que facilita a separação das colônias (Pande *et al.*, 2010).

Vale ressaltar que, além das bibliotecas de peptídeos expressos em fagos utilizadas na obtenção das sondas de nosso estudo, também podem ser obtidas bibliotecas de anticorpos, c-DNA, dentre outras, de acordo com a pesquisa a ser realizada.

#### **4. Imunossensores eletroquímicos**

Nos últimos anos a miniaturização dos equipamentos utilizados no processamento dos dados diagnósticos ou transdutores de sinal se tornou uma realidade, à medida que equipamentos cada vez menores vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de melhorar os custos e diminuir a quantidade das amostras utilizadas e até mesmo dos elementos sensores ou sondas de reconhecimento (Hayat e Marty, 2014). Já existem diversos equipamentos utilizando princípios eletroquímicos, ópticos, magnéticos, micro fluídicos, etc., capazes de serem operados sem a necessidade de um suporte laboratorial robusto. Nesse trabalho, daremos destaque para os transdutores eletroquímicos miniaturizados, que foram utilizados na leitura dos dados obtidos em nossos sensores.

Um transdutor eletroquímico nada mais é que um equipamento capaz de transformar a passagem de corrente elétrica em dados sobre as interações moleculares presentes na superfície do sensor. Existem diferentes métodos eletroquímicos de detecção dependendo do fenômeno a ser analisado: os que se baseiam na análise da corrente em si são chamados métodos

amperométricos, os que se baseiam na análise da diferença de potencial ou voltagem são chamados potenciométricos ou voltamétricos e aqueles baseados na análise da condutividade ou resistência são os métodos condutimétricos (Hayat e Marty, 2014). A escolha desses métodos vai depender de quais tipos de interações superficiais ocorrerão na camada sensora e de seu comportamento elétrico, e também de qual informação é desejada na análise final dos dados. Optamos por estudos de voltametria, pois este método, além de seu baixo custo operacional e de equipamentos, é considerado um dos mais sensíveis, pois consideram os fenômenos que ocorrem na interface da superfície do eletrodo com camada de solução adjacente, de modo a avaliar a ação de espécies eletroativas.

Por isso, são determinantes no desenvolvimento de um biossensor, o conhecimento do comportamento químico e afinidades existentes entre os elementos que compõem a camada ativa, material do eletrodo de trabalho, sonda, alvo e eletrólitos utilizados, e dos fenômenos de equilíbrio iônico entre estes elementos (Santana *et al.*, 2017).

Em se tratando de sistemas portáteis, alguns potenciostatos possibilitam a aplicação desses métodos utilizando-se de eletrodos impressos em microchips ou *screen printed electrodes*. Estes são compostos dos mais diversos tipos de materiais possibilitando uma infinidade de interações superficiais com os mais diversos tipos de sondas de reconhecimento (Hart *et al.*, 2004; Yamanaka *et al.* 2016).

Os microchips *screen printed* operam, em geral, utilizando o sistema de três eletrodos sobre uma estrutura cerâmica ou plástica inerte: eletrodo de trabalho, eletrodo de referência e contra eletrodo ou eletrodo auxiliar (Ricci *et al.*, 2012). O eletrodo de referência fornece um potencial fixo e definido, que é conhecido como potencial de referência. Ele é calculado com base na diferença de potencial entre o eletrodo de referência em questão e o eletrodo padrão de hidrogênio, que equivale a 0V (zero volts), mesmo variando a temperatura (Silva Jr. e Araújo Filho, 2000; Pacheco *et al.*, 2013). Além disso, o eletrodo de referência controla o potencial do eletrodo de trabalho, que varia de forma linear com o tempo. O eletrodo auxiliar, em contrapartida, equilibra a corrente no eletrodo de trabalho, recebendo-a e oscilando em potenciais de oxidação e

redução do eletrólito utilizado. Diversos microchips *screen printed* utilizam como referência um eletrodo de prata ou cloreto de prata, por ser um material barato, atóxico e estável, e o eletrodo auxiliar, geralmente, possui a mesma constituição do eletrodo de trabalho, onde acontecem todas as modificações superficiais necessárias para viabilizar o mecanismo de reconhecimento. Em nosso estudo utilizamos microchips com eletrodos de trabalho à base de grafite e ouro nanoestruturados.

## 5. Interações superficiais em biossensores

Outro aspecto importante na construção de um sensor eletroquímico é o método de imobilização de compostos de interesse na superfície do eletrodo de trabalho. Quanto mais específica a imobilização maior a quantidade de moléculas encontra-se funcional na superfície do eletrodo, aumentando a sensibilidade, estabilidade e longevidade do sistema (Santana *et al.*, 2017). Isso porque a transferência de cargas elétricas ocorre entre espécies eletroativas em distâncias atômicas (Cervenka *et al.*, 2012).

Quando ocorre a adesão física ou química de moléculas em uma superfície sólida dizemos que houve imobilização por adsorção. Se as moléculas ficam mergulhadas ou revestidas por outro componente intermediário acoplado na superfície sólida, ocorre imobilização por encapsulamento. Caso as moléculas se liguem covalentemente à superfície sólida do eletrodo, a imobilização se deu por ligação covalente ou covalente cruzada, ou *cross-linking*, quando ocorre uma cadeia reticulada de ligações covalentes em toda a superfície. Em sensores à base de enzimas as imobilizações do tipo covalente são as de escolha, pois os grupos funcionais dessas enzimas costumam se ligar mais facilmente à superfície dos eletrodos. Além desses, podemos listar também as monocamadas automontadas (SAMs), uma forma de imobilização sítio dirigida para realização de ligações “em cadeia”, formando um filme com as regiões de reconhecimento voltadas para a superfície da monocamada, e as imobilizações por beads magnéticos, utilizados para se “forçar” a interação de moléculas biológicas com a superfície do sólido (Ricci *et al.*, 2012).

Na adsorção ocorre uma relativa “transferência” de massa pela concentração de substâncias (adsorvato) na superfície de um elemento sólido

(adsorvente). A molécula, ao se deslocar para a superfície adsorvente perde gradativamente energia até “aderirem” a esta. Este fenômeno de equilíbrio dinâmico entre moléculas ocorre em função da temperatura. Ela pode se dar química ou fisicamente, dependendo do tipo de interação superficial. Forças de Van der Waals (dipolo-dipolo e polarização dipolo-induzido) e coesão molecular são processos físicos de adsorção, e são dependentes da área superficial e da polaridade do adsorvente. Já a partilha de elétrons de ligações químicas caracteriza a adsorção química, formando uma única camada na superfície com maior proximidade das moléculas de adsorvato, de forma irreversível e com liberação de energia (Vidal *et al.*, 2014; Do Nascimento, 2014). Utilizamos o método de adsorção em nossos estudos: em um primeiro estudo a quimissorção, imobilização por ligação entre grupos tiol e superfícies de ouro e, em nosso segundo estudo, a fisissorção de peptídeos de reconhecimento na superfície de eletrodos de grafite, associados a um novo indicador eletroquímico.

O planejamento da construção do biossensor tem início no estudo aprofundado da sonda de reconhecimento a ser utilizada. Em nosso estudo utilizamos sondas peptídicas miméticas de antígenos dos parasitas “alvo” obtidas pelo método denominado *Phage Display*. Esta tecnologia consiste na expressão e seleção por afinidade de proteínas ou peptídeos expressos em fusão com proteínas virais presentes em capsídeo de bacteriófagos. Os fagos recombinantes expressando peptídeos randômicos ou fragmentos de anticorpos combinatoriais podem ser selecionados por afinidade e a seguir expandidos em ciclos adicionais de crescimento em bactérias *E. coli* hospedeiras apropriadas (SMITH, 1985). A abordagem biotecnológica baseada em *Phage Display* nos permite identificar peptídeos específicos que detectam imunoglobulinas G circulantes específicas para diversas patologias, prováveis ligantes de auto anticorpos, com grande potencial diagnóstico, especialmente no formato de biossensores.

Conhecendo a sequência de aminoácidos dos peptídeos utilizados como sonda de reconhecimento e suas características é possível escolher o melhor material do eletrodo de trabalho e o método de imobilização deste peptídeo de modo a obter um sensor mais eficiente. É sabido que determinados aminoácidos possuem afinidade por determinados tipos de elementos químicos e este fato é

de grande valia na funcionalização de eletrodos. Também é possível a seleção de peptídeos com características estruturais desejadas não somente pela afinidade ao alvo, mas a materiais sólidos das superfícies dos eletrodos.

Kyani e Goliaei (2009) citam a ligação covalente entre peptídeos apolares e nanotubos de carbono, que são extremamente hidrofóbicos, e ainda que as adsorções não covalentes (tipo *Van der Waals*) quando ocorrem em nanotubos de carbono preservam sua geometria, suas propriedades mecânicas e elétricas e aumentam sua solubilidade. Além disso, que aminoácidos com cadeias aromáticas em sua composição possuem maior afinidade por nanotubos de carbono, e conseqüentemente essa afinidade aumenta em peptídeos com maior número de aminoácidos aromáticos e baixo valor médio de hidrofobicidade.

Palafox-Hernandez *et al.* (2014) sugerem, através do cálculo da energia livre de ligação, que os aminoácidos Cisteína, Arginina, Tirosina e Triptofano possuem forte afinidade em se ligar a moléculas de ouro, enquanto Arginina, Metionina, Cisteína, Aspartato, e Serina são fortes ligantes à prata. As simulações mostraram que a adsorção ao ouro se dá via contato direto, enquanto a adsorção na prata (Ag111) ocorre por contato direto associado à mediação pelo solvente.

Em estudo de Humblot e colaboradores (2014) com espectroscopia de foto emissão de raios X, pode ser observado que o modo de interação com o ouro e o mecanismo de crescimento da camada de adsorção é sensível à composição dos peptídeos. A interação “quelante” entre peptídeos e ouro se dá via grupamentos ácidos dessas moléculas. Além disso, a presença de ligações de hidrogênio guia o modo de crescimento e o tamanho dos agregados peptídicos na superfície de ouro e os grupos -COOH encontram-se desprotonados em peptídeos adsorvidos.

Tendo em vista a construção de um sensor para identificação de pacientes portadores de estrogiloidíase, utilizamos dois peptídeos miméticos de antígenos de *Strongyloides sp* previamente selecionados e testados em ELISA (C10 e D3; Feliciano *et al.*, 2014) como sonda de reconhecimento de imunoglobulinas G “anti-estrogiloidíase” em soro humano. Ambos possuem quatro resíduos de cisteína em sua cadeia peptídica de 24 aminoácidos, nas

posições 2, 10, 16 e 24, característica que levou à escolha de eletrodos de ouro nanoestruturados como material de base da camada sensora. A cisteína possui um grupo funcional tiol, capaz de se ligar ao ouro e outros metais pela afinidade do sulfeto a metais “moles”, formando uma ligação forte do tipo quimissorção covalente. A partir daí as cadeias carbônicas se organizam espontaneamente de modo a formar um filme composto pelas moléculas peptídicas estáveis e ordenadas por interações do tipo Van der Waals entre os grupos R – alquila (Benites *et al.*, 2014).

Porém, nem sempre é possível o estabelecimento de ligações altamente específicas entre os elementos da camada sensora. Ligações fortes envolvendo eletrodo de carbono e peptídeos precisam ser construídas com a ajuda de compostos químicos “ligantes” ou por métodos de adsorção física entre o sólido superficial e o elemento biológico de reconhecimento. O glutaraldeído, por exemplo, é um elemento químico que promove ligações covalentes do tipo *cross-linking*, disponibilizando ligações covalentes na superfície dos eletrodos de carbono (Oliveira *et al.*, 2015; Santana *et al.*, 2017).

O carbono é um não metal sólido à temperatura ambiente. Possui 4 elétrons em sua camada de valência, sendo, portanto, capaz de realizar quatro ligações covalentes. Quando na forma de grafite, se dispõe em anéis hexagonais que alternam ligações duplas e simples (3 elétrons em orbitais híbridos  $sp^2$  e 1 em orbital  $p$ ), e as camadas unidas por forças de *van der Waals*, o que permite a condução de eletricidade por toda a sua estrutura.

Para “ativação” do carbono depositado na superfície do eletrodo de trabalho, diversos pré-tratamentos encontram-se descritos na literatura. Em nosso estudo, tanto os eletrodos de carbono (110) quanto os de ouro (220BT) passaram por pelo menos 5 ciclos de voltametria cíclica em ácido sulfúrico 0,5M, janela de -0,3 a 1,5V, de modo a promover uma espécie de limpeza superficial, principalmente em relação aos materiais de adesão da tinta eletroquímica na superfície da cerâmica, que interferem na migração de elétrons pela camada  $sp^2$  e nas interações com as moléculas adsorvidas, conforme visto na figura 4 (Hayat e Marty, 2014; Faria *et al.*, 2019).

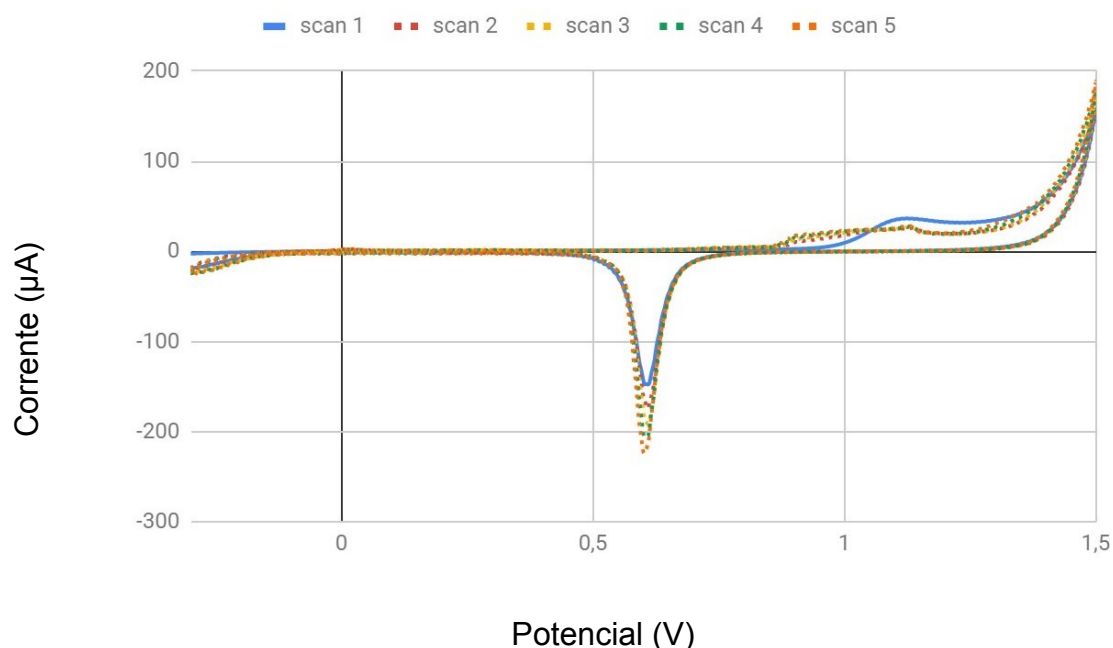


Figura 4. Voltametria cíclica (5 scans) em eletrodo 220BT com objetivo de limpeza superficial e eliminação de interferentes da fabricação. Solução de Ácido Sulfúrico a 0,5M; scan rate 0,1V/s.

A presença de aminoácidos alifáticos na estrutura dos peptídeos de reconhecimento da leishmaniose visceral – LC1 (6 resíduos), leishmaniose tegumentar – LT (8 resíduos), estrogiloidíase – D3 (8 resíduos) e hanseníase – M3R (8 resíduos) e a predominante hidrofobicidade (a maioria com carga elétrica negativa em pH neutro, com exceção do peptídeo LT, de carga zero) contribuíram para a melhor interação com a superfície de carbono na camada sensora. Para o peptídeo de reconhecimento da hanseníase, esta interação com a superfície de carbono, provavelmente, se deu também através do grande número de aminoácidos aromáticos (9 resíduos).

Penna e colaboradores (2015) realizaram um estudo aprofundado sobre as interações entre carbono e os aminoácidos de um peptídeo selecionado em *biopanning* de *Phage Display* para afinidade com carbono e concluíram que a hidrofobicidade é um fator determinante na adsorção dessas biomoléculas em superfícies à base de carbono. O processo de adsorção foi dividido em etapas conforme a aproximação com a superfície, desde 12 até 2 angstroms, e as etapas assim descritas: a massa do solvente passa por um processo de difusão na interface sólido/líquido e realizando ancoragens reversíveis; algumas partes do peptídeos penetram a segunda interface da lâmina aquosa onde se inicia o

contado dessas regiões com os átomos da superfície sólida, que é o início das interações fortes irreversíveis, passando, posteriormente ao rearranjo do peptídeo nesta superfície, de modo a aumentar sua área de interação para a ligação definitiva, tornando o processo definitivamente irreversível. De acordo com os autores os aminoácidos alifáticos ou não polares possuem um papel fundamental no mecanismo de adsorção, principalmente na fase de difusão, e os aromáticos e hidrofóbicos, como isoleucina, tirosina e metionina, possuem propriedades de ancoragem no grafite.

Confirmando esta afinidade temos ainda estudo de Rajest e colaboradores (2009), onde ele compara as interações de triptofano, tirosina, fenilalanina e histidina quanto à maior ou menor afinidade por superfícies de grafeno e nanotubos de carbono. A interação do triptofano (aromático) foi superior à da histidina (com grupo R positivo), mostrando alterações no anel benzênico compatíveis com interações com grafeno e nanotubos via  $\pi$ - $\pi$ . De acordo com Rodríguez e colaboradores (2016), a histidina interage com o grafeno por interações físicas de *van der Waals*, que a transferência de cargas do grafeno para a histidina aumenta com a inclusão de grupos carboxílicos e amina no sistema.

Nossos peptídeos de escolha para a adsorção na superfície do carbono possuem um grande número de aminoácidos alifáticos, uniformemente distribuídos em sua estrutura, o que colaborou para a funcionalização na superfície do eletrodo de grafite, sem a necessidade de promoção de ligações covalentes por compostos ligantes, como o glutaraldeído. Vale ressaltar que os experimentos realizados na tentativa de promover uma ligação do tipo *cross-linking* na superfície dos eletrodos de grafite mostraram-se ineficientes na diferenciação dos soros (dados não incluídos), o que pode ter ocorrido por incompatibilidade entre o ligante e nosso indicador eletroquímico que, conforme discutiremos no artigo 2, também interage fortemente com a superfície de carbono.



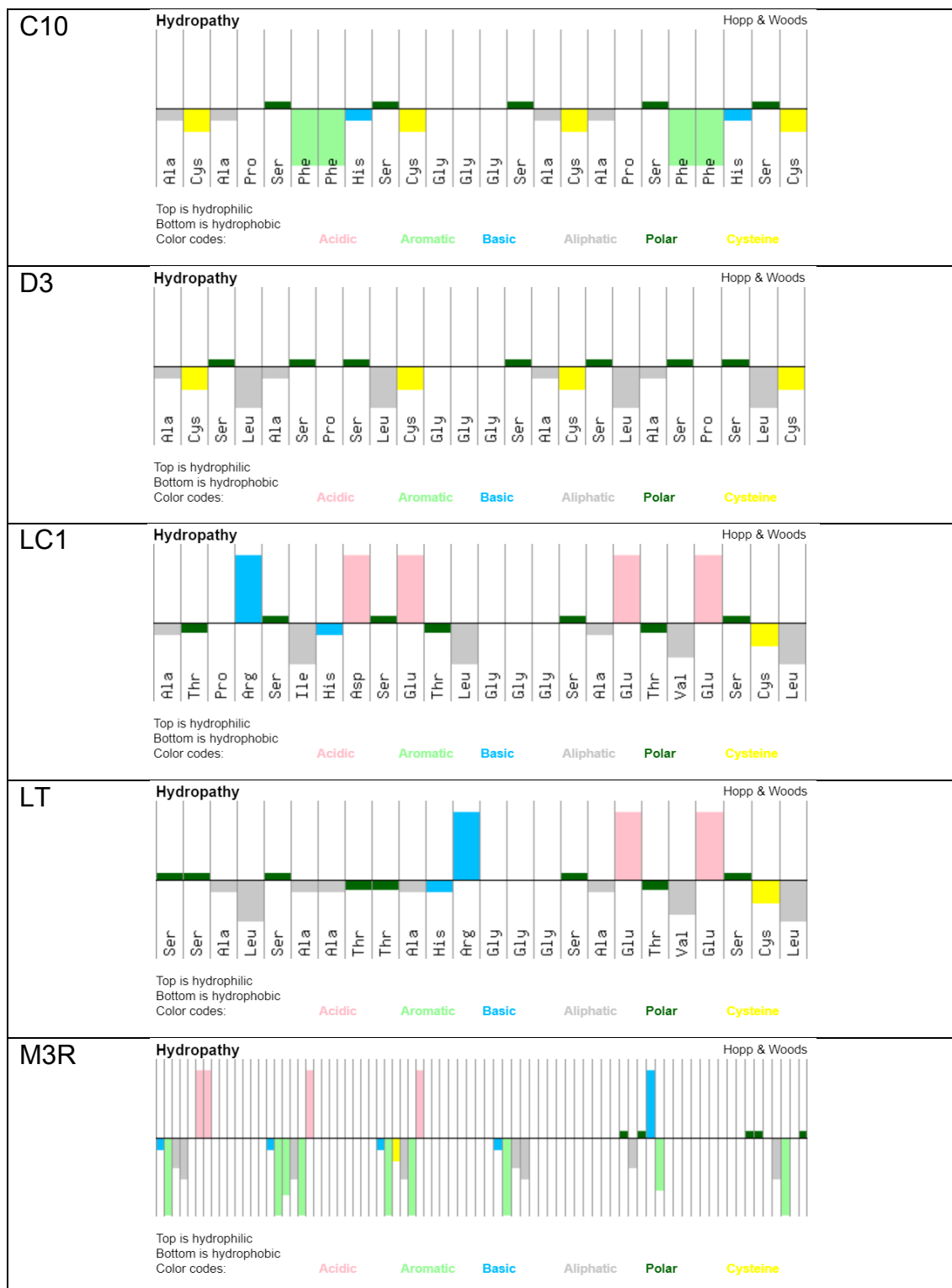


Figura 5. Estrutura dos peptídeos mimotópos utilizados como sondas de reconhecimento de IgGs em nossos estudos. Produtos protegidos pelas patentes PI0903089-1A2 e BR102014003636-9.

O processo de adsorção ocorre numa interface aquosa entre o eletrodo e as biomoléculas. É necessário que esse meio esteja em condições fisiológicas, caso contrário, as variações de pH podem alterar a conformação das

biomoléculas, podendo comprometer principalmente as regiões de reconhecimento e consecutivamente prejudicando o funcionamento do biossensor. Mesmo assim, não há garantias quando à orientação desses peptídeos de modo a expor as regiões de reconhecimento das imunoglobulinas de forma ordenada, fato este que deve interferir de alguma forma na resposta de reconhecimento identificada em nossos ensaios eletroquímicos, sendo um fator limitante do estudo.

Outro fator importante para o sucesso da funcionalização da camada sensora foi a adoção de um método semelhante ao imune ensaio ELISA, onde as biomoléculas são adicionadas em etapas, como em um sanduiche (Ricci *et al.*, 2012). Primeiramente imobilizamos a sonda de reconhecimento na superfície do eletrodo de trabalho, depois realizamos o bloqueio da superfície para ligações inespecíficas com BSA, para só então adicionar os soros e controles a serem analisados. Não utilizamos anticorpos secundários, pois apenas a reação antígeno-anticorpo foi nosso objeto de estudo. A ordem de inclusão do indicador eletroquímico também foi nosso objeto de estudo no artigo 2. As proporções entre os peptídeos e os soros foram mantidas em relação aos imunoenaios realizados previamente para essas biomoléculas, de modo a permitir a comparação entre os resultados e também por serem concentrações onde houve sucesso no reconhecimento.

Acreditamos que a manutenção da interface aquosa durante as etapas de adição das biomoléculas, de modo a promover sua adsorção, permitiu que as interações eletrostáticas entre todos os componentes ocorressem da forma mais natural possível, principalmente as reações antígeno-anticorpo em predominância às demais, por serem interações fortes. Não foi possível, por exemplo, pelo método de funcionalização utilizado, a eliminação total de interações inespecíficas com os controles utilizados, conforme evidenciado nos resultados de voltametria desses controles, pela grande afinidade de nosso indicador a moléculas proteicas.

## **6. Indicadores eletroquímicos**

Carbono e o grafite possuem baixa atividade redox (Yamanaka *et al.*, 2016). Sendo assim, o uso de mediadores e indicadores eletroquímicos viabiliza

seu uso como eletrodo, também para estudo de moléculas com baixo ou nenhum potencial redox, como os peptídeos. Em nossos estudos utilizamos uma solução contendo duas sondas redox amplamente conhecidas e estudadas, a solução de ferricianeto ( $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ /ferrocianeto ( $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ ) e um novo indicador e mediador eletroquímico com grande especificidade para moléculas proteicas, a 4-Dimetilaminoantipirina. Da mesma forma, nanopartículas metálicas vêm sendo utilizadas para amplificação do sinal eletroquímico em imunossensores, favorecendo o transporte de elétrons na camada sensora (Cho *et al.*, 2018).

O sistema redox ferro/ferri, é um sistema eletroquímico reversível onde um potencial positivo oxida o  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$  em  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ , gerando uma corrente anódica pela liberação de elétrons. Quando a concentração de ferrocianeto diminui, a corrente também reduz até ocorrer à redução do ferricianeto formado em ferrocianeto novamente, reiniciando o ciclo. As moléculas adicionadas na superfície do eletrodo de trabalho irão promover um desequilíbrio nesta reação de oxirredução, diminuindo ou aumentando a corrente no potencial de oxidação ou de redução (Marasinghe, 2017). A oxidação/redução do eletrólito ainda ocorrerá, mas em menor ou maior grau, considerando que os peptídeos interagem química e fisicamente com a superfície do eletrodo de trabalho. Baseado nesta teoria, foram realizados os testes utilizando peptídeos miméticos de alta afinidade para IgGs “anti-estrongiloidíase”, em soros positivos e controles (negativo e outras parasitoses), e ainda uma fração detergente de antígenos do parasita (Artigo 1).

O 4-dimetilaminoantipirina (4-DMAP) é um derivado da dipirona que contem em sua estrutura um grupo substituinte dimetilamina, um pirazol e um anel aromático, que permite interações com moléculas proteicas e superfícies à base de carbono. Há uma vasta literatura disponível sobre seu homólogo aminoantipirina (AAP), porém a 4-DMAP ainda não foi explorado em suas funções, além dos estudos de seus aspectos tóxicos *in vivo* (Hu *et al.*, 2010). Por isso, encontram-se descritos dois potenciais de oxidação para as aminoantipirinas: 0,6V, atribuído à oxidação do grupo pirazol, e 0,9V, que seria o potencial de oxidação do anel aromático (Gowda *et al.*, 2014). Curiosamente, não evidenciamos nenhum desses potenciais em nossos estudos, apenas um pico de oxidação em 0,2V, algo ainda não descrito na literatura para este composto.

Acreditamos que esse potencial favorável em 0,2V se refere à oxidação do Nitrogênio no grupo substituinte Dimetilamina presente na 4-DMAP, ausente na AAP, e que a inexistência dos demais potenciais de oxidação encontrados no AAP, se devem às interações do grupo pirazol e dos anéis aromáticos com as biomoléculas adsorvidas e a camada sensora de grafite, respectivamente.

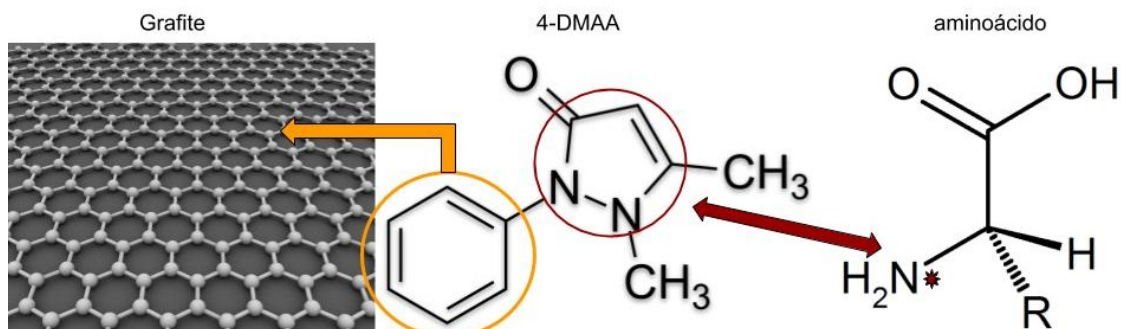


Figura 6. Demonstração das interações entre o anel aromático das antipirinas e a superfície de grafite, e do pirazol com os aminoácidos.

Em nossos estudos, a 4-DMAP não interagiu bem com eletrodos de ouro, certamente lixiviando durante as etapas de lavagem, pois não obtivemos resposta satisfatória quanto à sua oxidação nessa superfície.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo geral**

Estudar as interações entre peptídeos, eletrodos impressos e indicadores eletroquímicos utilizando voltametria para subsidiar o desenvolvimento de imunossensores eletroquímicos.

### **Objetivos específicos**

Analisar as interações entre os peptídeos e a superfície dos eletrodos de modo a eleger as melhores características dos peptídeos para promover sua adsorção na superfície da camada sensora;

Verificar o reconhecimento das IgGs específicas pelos peptídeos por meio da variação da intensidade de corrente e potencial em voltametria cíclica e de pulso diferencial;

Analisar as interações entre um derivado de pirazol e os diversos componentes da camada sensora;

**Artigo 1.**

**Biological determinants and their interface with Nano porous gold electrode as critical components of the electrochemical response in serological analysis**

**Biological determinants and their interface with Nano porous gold electrode as critical components of the electrochemical response in serological analysis**

Francielli C. C. Melo, Luiz R. Goulart, Anderson L. do Valle, Renata P. Alves-Balvedi, Rodrigues LP, Vanessa S. Ribeiro; Matias-Colombo BF; Nágilla D. Feliciano; Julia M. Costa-Cruz

*Institute of Biotechnology, Laboratory of Nanobiotechnology, Federal University of Uberlandia - Brazil.*

**\* Corresponding Authors:**

FCCM - francielli.melo@gmail.com; LRG - lrgoulart@ufu.br

**Conflict of Interests:**

The authors declare no conflict of interest.

## **Abstract**

Quantification of biological constituents through electrochemistry is the utmost goal in biomedical applications, but conversion of biological information into electronic signals is challenging due to the complex biological environment. Our hypothesis is that antigens' sequences, quantity and diversity deposited onto functionalized electrodes' surface may also be a critical factor for differential electrochemical response compared to ELISA due to their specific interactions with electrodes' surface. We have used three antigens for detection of serum IgG of human strongyloidiasis for electrochemical detection with known diagnostic parameters and same serological sensitivity. The Nanoporous gold electrode and ELISA parameters for all three antigens were considered fixed parameters. We used human sera from three populations: *Strongyloides stercoralis* positive, negative and positive for other parasitic infections. The three antigens consisted of two single-epitope synthetic peptides (C10 and D3) with different sequences, and a multi-epitope antigen (Dp) composed of integral membrane proteins. The electrochemical response of peptides D3 and C10 against positive sera was significantly higher than the Dp, contrarily to ELISA parameters. The largest differences of positive sera with *S. stercoralis* from other parasitic infections and negative controls were respectively observed for D3, followed by C10 and Dp. The D3 antigen presented the highest and most specific signal, probably conditioned by its higher specificity coupled with a greater quantity of a unique epitope onto the surface. Our results bring new breadth to electrochemical sensors, indicating that the direct conversion of a biological event into an electronic signal relies on the interaction of materials interface with probes and their specificity or affinity to biological samples.

**Key Words:** Immunosensor, strongyloidiasis, single-epitope peptides, multi-epitope antigens, electrode surface interactions, biological interface.



## 1. Introduction

Quantification of biological constituents through electrochemistry requires conversion of biological information into electronic signals; however, not always electrodes work with specific antigens, probably due to the complexity of the biological environment. Connection of electronic devices with functionalized electrodes is dependent on different materials. We believe that the direct conversion of a biological event into an electronic signal relies on the interaction of materials interface with biological samples and probes, which cannot be seen in a simplistic view. In fact, it is expected that the complex interactions among biosensor-sample will require intensive investigation in order to optimize electrochemical signals.

The understanding of fluids' behavior at the interfacial layer next to the surface of a solid material is critical for sensing applications. When the solid surface is charged, it can drive further changes in the interfacial liquid. This phenomenon has been explored through the characterization of the interfacial water structure at the surface of bare gold electrodes. With positive potentials or no potential, the layer was highly structured, and at negative potentials, the layer was more like less dense water (Velasco-Velez *et al.*, 2014). Therefore, it is expected that complex fluids and probes will present multifaceted performances in different potentials, and therefore, sensors must be extensively optimized, and probably conventional parameters of immunoassays cannot be reproduced in electrochemical sensors.

Nano porous gold electrodes have important characteristics that make them ideally suited for electrochemical immunosensing, which include large surface area, superior conductivity, biocompatibility, high stability, and a well-characterized thiol-gold surface chemistry. Besides, the high surface area enables a greater amount of probes to be immobilized onto the surface relative to that obtained on a flat, planar surface, providing greater access to the target substrate (Collinson 2013).

An electrochemical immunosensor was developed for detection of alpha-fetoprotein (AFP) based on a three-dimensional nanostructure gold electrode using a square-wave oxidation-reduction cycle technique for detection of a pure AFP antigen using a sandwich ELISA system, mimicking the protocol used in a

conventional immunoassay (Zhong *et al.*, 2015); however, such system required a capture monoclonal antibody and a horseradish peroxidase-conjugated mouse monoclonal antibody probe both directed against AFP, and the electrochemical measurements were performed after adding a TMB substrate to the complex.

We have developed a simple diagnostic to strongyloidiasis, a major worldwide neglected public health disease, caused by a helminth infection, *Strongyloides stercoralis* (Olsen *et al.*, 2009), by fixing the electrode material, the device characteristics, and serological parameters for three different antigens. ELISA standards for each antigen were compared with the device responses. We hypothesized that interactions of biological probes with the electrodes' polymeric film are dependent on probes' sequence, amount and diversity, which may lead to differential electrochemical responses, and such aspects will be explored herein.

## **2. Material and Methods**

### *2.1. Ethics Statement*

This study was conducted according to the ethical guidelines of the Brazilian Ministry of Health, with protocols and procedures approved by the UFU Research Ethics Committee, under the protocol number CEP 307.605, approved in 2013. Serum samples were obtained at the Clinics' Hospital of UFU, and signed consent forms were obtained from all patients.

### *2.2. Study Population*

This study used nine samples divided into three groups of patients (1.0  $\mu$ L from each). Group 1 (G1) consisted of three samples from patients living in an endemic area with confirmed parasitological diagnosis of strongyloidiasis by using (BAERMANN and G 1917) and (Moraes 1948) method, based on positive larval thermo-hydrotropism and (Lutz 1919) method, a gravity sedimentation technique. Group 2 (G2) included three pooled samples from patients with positive diagnosis of other parasitic diseases, including *Ascaris lumbricoides* (n=8), *Enterobius vermicularis* (n=5), *Giardia lamblia* (n=5), hookworm (n=7), *Hymenolepis nana* (n=4), *Schistosoma mansoni* (n=4), *Taenia* sp. (n=6), and *Trichuris trichiura* (n=5). Samples from

Groups 1 and 2 were obtained from patients affected by single infection. Group 3 (G3) contained samples from apparently healthy individuals, based on clinical observation without any evidence of contact with *S. stercoralis* infection, or previous history of strongyloidiasis, and with three negative tests of fecal samples.

For electrochemical detection, reaction conditions were similarly performed to those described elsewhere (Feliciano *et al.*, 2010) and (Feliciano *et al.*, 2014), following the ELISA protocols summarized in Table 1.

Table 1. Three antigens used for electrochemical detection, their reaction conditions, diagnostic parameters, and references.

Antigen	Reaction Condition	ELISA index* or Cut-off**	Reference
<b>Detergent phase (Dp)</b>	5mg/mL antigen/well; Blocking solution (PBS + 0.05% Tween 20 + 3% Skim milk); Serum 1:80 in PBST; Anti-IgG 1:2000 in PBST	2.346*	(Nágilla Daliane Feliciano <i>et al.</i> , 2010)
<b>Peptide C10</b>	1mg/mL antigen/well; Serum 1:160 in PBS 5% BSA; Anti-IgG 1:2000 in PBS + 5% BSA	0.307**	(Nágilla D. Feliciano <i>et al.</i> , 2016)
<b>Peptide D3</b>	1mg/mL antigen/well; Serum 1:160 in PBS 5% BSA; Anti-IgG 1:2000 in PBS + 5% BSA	0.288**	(Nágilla D. Feliciano <i>et al.</i> , 2016)

### 2.3. Antigens

Antigens used in this study were chosen based on previous diagnostic parameters obtained in serological tests (ELISA), which detected IgG in serum

samples from patients with strongyloidiasis with the same sensitivity (Table 1). The three antigens consisted of a detergent phase (Dp) with multi-epitope proteins (Feliciano *et al.*, 2010; Ribeiro *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2014), and two mono-epitope peptides with different amino acid sequences, named C10 and D3 (Feliciano *et al.*, 2014; Feliciano *et al.*, 2016).

The Dp is a fraction obtained by a solution of Triton X-114, a non-ionic surfactant that is homogeneous at 0°C, but separates into detergent and aqueous phases at 20°C. It is composed of integral membrane proteins of amphiphilic nature. The peptide design was based on mimotopes sequences originated from phage display selections, as previously described by our group (Feliciano *et al.*, 2014). Each synthetic peptide consisted of two repetitive epitope motifs spaced by GGGS, followed by modifications with BSA coupled to the N-terminal and an amide to the carboxy-terminal according to (Feliciano *et al.*, 2016).

The isoelectric points of peptides were calculated through the server “isoelectric.ovh.org” (Kozlowski 2016), in order to aid the design of the study regarding the previous steps of preparation of the electrodes before the functionalization of the biomolecules.

#### *2.4. Electrodes and the Potentiostat Apparatus*

All electrochemical measurements were performed in a low temperature-synthesized Nano porous gold screen-printed electrode (BT 220, DropSens, Spain), with the following dimensions 33 x 10 x 0.5 mm. Working (4 mm diameter) and counter electrodes are made of gold polymer, whereas the reference electrode and electrical contacts are made of silver (Figure 1).

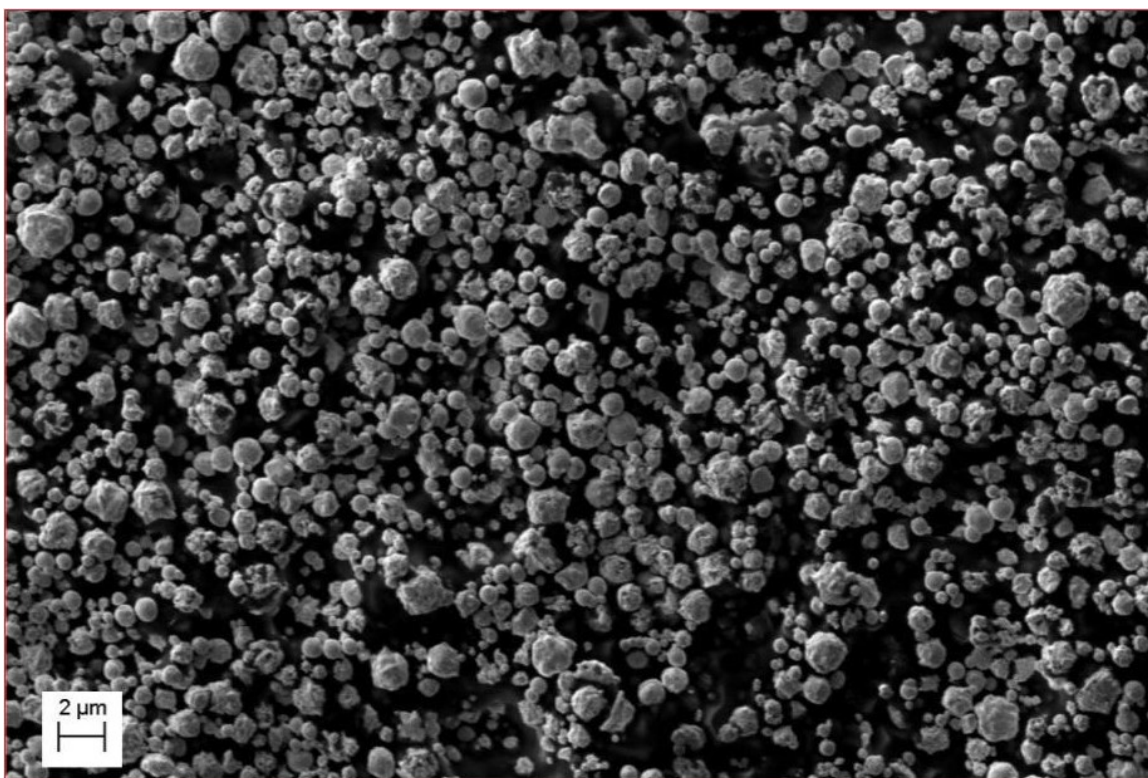


Figure 1: Nano porous surface of work electrode. Agglomeration of gold particles from micrometric to nanometric leading to the formation of numerous pores and increasing the surface of the electrode (Scanning Electron Microscopy - Multiuser Microscopy Lab, Federal University of Uberlandia, Brazil).

To assess the conductivity of electrodes and for optimization of detection, cyclic voltammetry were carried out on pure gold electrode, without any biomolecule, and aqueous solution of  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$  and 0.1 MKCl, pH 7.0, and current changes were recorded. Measurements were carried out in 5mM  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4}$  (1:1 solution), which served as a redox probe containing 0.1M KCl. The potentiostat PalmSens 3 (PalmSens, Netherlands) were used with the PSTrace software at the Laboratory of Nanobiotechnology from the Federal University of Uberlandia, MG, Brazil.

### *2.5. Electrochemical Measurements*

All electrochemical assays were conducted in triplicate. To test the immobilization of probes onto the gold electrodes and the serum IgG detection, electrochemical analyses were carried out to investigate whether electrochemical responses were different when compared to ELISA results, which could be only interconnected with materials interface among electrodes and different biological probes.

Briefly, for BT 220 electrode functionalization, 2 $\mu$ L of probes solution (C10 or D3 1 $\mu$ g/ $\mu$ L) or D phase (5.0 $\mu$ g/ $\mu$ L) onto the working electrode surface, according to previous standardization of ELISA protocols. The electrodes were incubated at room temperature (25°C  $\pm$  1) for 20 min, washed with 1mL phosphate buffer solution (0.1mol.L<sup>-1</sup>, pH 7.4) and dried. The working electrode surface was blocked with 2.0 $\mu$ L of a BSA 0,5%, diluted in phosphate buffer solution, for 20 minutes at room temperature (25°C  $\pm$  1) to eliminate the non-specific binding effect and block the remaining active sites, washing was performed again with 1mL of phosphate buffer solution (0.1mol. L<sup>-1</sup>, pH 7.4) and electrodes were dried. For direct measurements, electrodes were incubated with 2 $\mu$ L of serum samples from patients from G1, G2 and G3 for 20 minutes at room temperature (25°C  $\pm$  1), and then electrodes were washed again with 1 mL of phosphate buffer solution and air-dried. All measurements were performed through differential pulse voltammetry in the presence of the probe, blocking solution and target sera from groups G1, G2 and G3.

## *2.6. Electrochemical detection*

Differential Pulse Voltammetry (VPD) was the method of choice to monitor the changes caused by the redox probe on the surface of gold electrodes and a more sensitive method to study the faradaic current through elimination of the capacitive interference type current that occurs in the interface electrode solution containing 5,0mM [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>4-/3-</sup> and 0.1M KCl to evaluate the conductivity changes of the system.

The basic parameters used for the readings were: modulation amplitude (pulse E): 0.015mV; pulse interval (pulse t): 0.06s; scanning rate:15 mV.s<sup>-1</sup> (0.002V step); current range 1nA to 10mA, time equilibration 2s, potential -0.2V to 0.9V.

## *2.7. Electrodes' Surface Analyses*

Surface analyses were recorded using Atomic Force Microscope Model XE-70 manufactured by Park System® and SPM 9600® (Shimadzu Corp., Japan). The AFM images were generated at the Laboratory of New Insulating and Semiconductor Materials of the Federal University of Uberlandia, MG, Brazil, through swept in 10 x 10nm using the non-contact mode, and resolution of 10

nm. Structural and topographical observations of the sensors' surfaces were performed prior and after the probe immobilization, after blocking solution, and after serum incubation.

### **3. Results and Discussion**

#### *3.1 Probe-target-work electrode surface interaction and electrochemical approaches*

The cyclic voltammetry cyclic behavior of the redox pair in gold electrode ( $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$  and 0.1M KCl) is well described in the literature. In addition, the electrolyte redox activity of the gold electrode exhibits a faradaic behavior. So, we consider as unnecessary any previous study.

The positive potential applied prior to the surface functionalization with the previous cited solution works like a baseline to eliminate negative charges that could be present on the electrode, leaving it positively charged and allowing the best use of the peptide probes that are negatively charged at the working pH of 7.4 (isoelectric point at pH 6.43 for the probe C10, and pH 4.91 for probe D3).

We observed a decreasing current in VPD when recognition of the target by the peptide probe occurred (Figure 2). However, G1, G2 and G3 probe groups showed different performances, and the difference among them can be explained by several factors related to the molecular interactions in the proposed system.

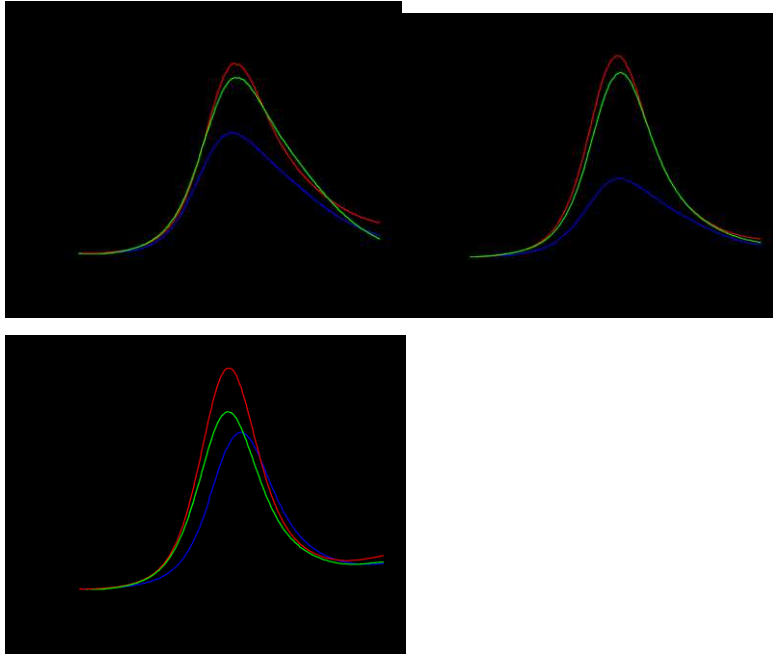


Figure 2: Differential Pulse Voltammetry (DPV): (A) C10 peptide, (B) D3 peptide, and (C) detergent phase with different pools of serum samples. Blue lines indicate positive serum for strongyloidiasis, red and green lines represent sera from negative and other parasitic diseases, respectively. Electrolytic solution  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$  and KCl, electrode BT 220, scan rate=  $15.0\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ .

First, we must consider that the detergent phase extracted from *S. venezuelensis* (Dp) is formed by a pool of hydrophobic proteins of the parasite (Feliciano *et al.*, 2010), and its interaction with the gold electrode can occur through hydrophobic, ionic interactions or chemical bonds by Thiol groups, depending on the type and amino acid sequences that form these proteins. Due to the protein diversity and probably due to the predominance of weak physical interactions between gold and these amino acids, the surface functionalization will occur in a more disordered way and we will not always have the free epitopes for regions of free contact with the immunoglobulins (Belluzo *et al.*, 2011). In these cases, some of the probes could not recognize their target, which could interfere with the values of the oxidation current measured, explaining the smaller differentiation between the groups in the Dp fraction. Another possible interference in the electrochemical results of this detergent fraction may be due to the effect of Triton X-114 used in the antigen fractionation process.

In contrast, the C10 and D3 probes structures had a better interaction with the working electrode material because they are epitope specific. In a 2014 study by (Palafox-Hernandez *et al.*, 2014) about interactions between peptides



and silver or gold surfaces, it has been shown that cysteine (Cys), arginine (Arg), tyrosine (Tyr) and tryptophan (Trp) have higher affinity for gold surfaces, and that the adsorption occurs essentially through direct contact between molecules, and not mediated by the solvent. The cysteine is covalently bonded to gold by dissociation of -SH group, forming S-Au bridges. Both synthetic peptides, C10 and D3, have four cysteine residues distributed almost equidistant from their 24 amino acids. This determines the adsorption process to the electrodes' gold surface, requiring no other mechanisms to functionalize the working electrode.

In this case, since there is only one type of polymer structure being adsorbed on the surface, the epitopes are expected to be arranged more homogeneously and accessible to IgGs, what facilitates the recognition. A study by (Kühnle *et al.*, 2004) corroborates the observation about the adsorption of cysteine on the gold surface. The cysteine may be adsorbed on the entire surface of gold naturally in double unidirectional lines or double lobes distributed randomly over the surface, forming cysteine dimers. In addition to the peptide-gold interactions, we must consider that amino acids between distinct peptides form hydrogen bonds between each other, and these bonds lead to the formation of aggregates of peptides on the gold surface (Humblot *et al.*, 2014), increasing the amount of probe molecules on electrode surface and consequently recognition of the target, what is verified in the oxidation potentials of the studied groups. This explains the difference between the results obtained between synthetic peptides and detergent fraction.

The reduction of the current values for the G1 group, positive for strongyloidiasis, is probably due to the electron transfer kinetics block of  $[Fe(CN)_6]^{4- / 3-}$  (Puiu *et al.*, 2014); (Li *et al.*, 2009). This occurs because both the peptide probe and target IgG are not electron donating species for the system, generating resistivity between electrolyte and gold surface.

Some amino acids are electroactive compounds, and many have known antioxidant properties in metabolic chains. Masek and col. (2014) describe that compounds with antioxidant properties have a low oxidation potential, like cysteine (Half-wave potential 0.38V) and its oxidation product cystine (Half-wave potential 0.57V), both with low donate electron capacity. Their experiments were performed using Platine electrodes and Ferri/Ferrocyanide electrolite. For gold-

based electrodes (in bars or with gold nanoparticles), the oxidation current value of Cysteine is dependent on the pH of electrolyte, being maximum at 5.33, close to the pKa of this amino acid (5.05), at potential 1.11V. Oxidation potentials lower than this value only can be obtained using lower pH values (Wang e Huang, 2012).

Immunoglobulins tend to present positive charges at neutral pH, which can be seen in the electrophoresis by their migration in gamma globulin fraction. Therefore, these species would be important interferents in the flow of electrons of the system when combined to the antigens immobilized in the electrode surface. The combination of all these factors possibly led to the reduction of the oxidation peak values in the readings of G1 group (positive serum – C10=6.6 $\mu$ A, D3=6.75 $\mu$ A, dp=20.8 $\mu$ A), which did not occur for G2 (other parasitosis – C10=9.6 $\mu$ A, D3=15.5 $\mu$ A and dp= 23.9 $\mu$ A) and G3 (serum negative – C10=10.3 $\mu$ A, D3=16.8 $\mu$ A and dp=29.5 $\mu$ A), due to the absence of the anti-strongyloidiasis immunoglobulin in these sera.

Besides, the electrode we used has Nano porous gold presents on it, and its surface is responsible for increasing the Faradaic current due to the larger area of the electrode in contact with the reagents, consequently increasing its sensitivity and limits of detection (Collinson, 2013). Our system was able to detect anti-Strongyloidiasis IgGs in a very small serum fractions of 2 microliters at the dilutions of 1:80 or 1: 160, according to the probe used.

Although the evaluated sera contain many interfering substances, such as urea, uric acid, glutamate and albumin, we can consider that there was no disturb of the detection process by these substances (Santos *et al.*, 2012); (Araujo *et al.*, 2016). The best results using C10 and D3 for the detection of strongyloidiasis are in agreement with previously published reports (Wu *et al.*, 2010); (Santos *et al.*, 2012); (Araujo *et al.*, 2016), demonstrating that the peptides obtained from Phage Display selections are more specific than the pool of membrane peptides, such as Dp. Our findings also demonstrate that the D3 peptide was superior in electrochemical response probably because it has a higher specificity than C10, which is equivalent to say higher antigen higher antibody affinity (Feliciano *et al.*, 2010). The peptides synthesized chemically

proved to be an important and versatile diagnostic tool to detect the target IgG (Wu *et al.*, 2010).

### 3.2. Surface analysis

Atomic force microscopy was performed to evaluate the morphological changes on the surface of the electrode after the interaction of the peptide with the sera of groups G1, G2 and G3. This technique is used to visualize images of surfaces with antigens (Ag) or antibodies (Ab) adsorbed or combined due to Ag / Ab recognition (Cecchet *et al.*, 2007). Topographic images recorded roughness differences according to the degree of interaction/ immobilization of probe recognized by IgG on gold surface (Figure 3). Considering that IgG is much larger than the probes, a rougher surface is expected on seropositive group electrodes. The roughness coefficient (Rq) can be found in Table 2.

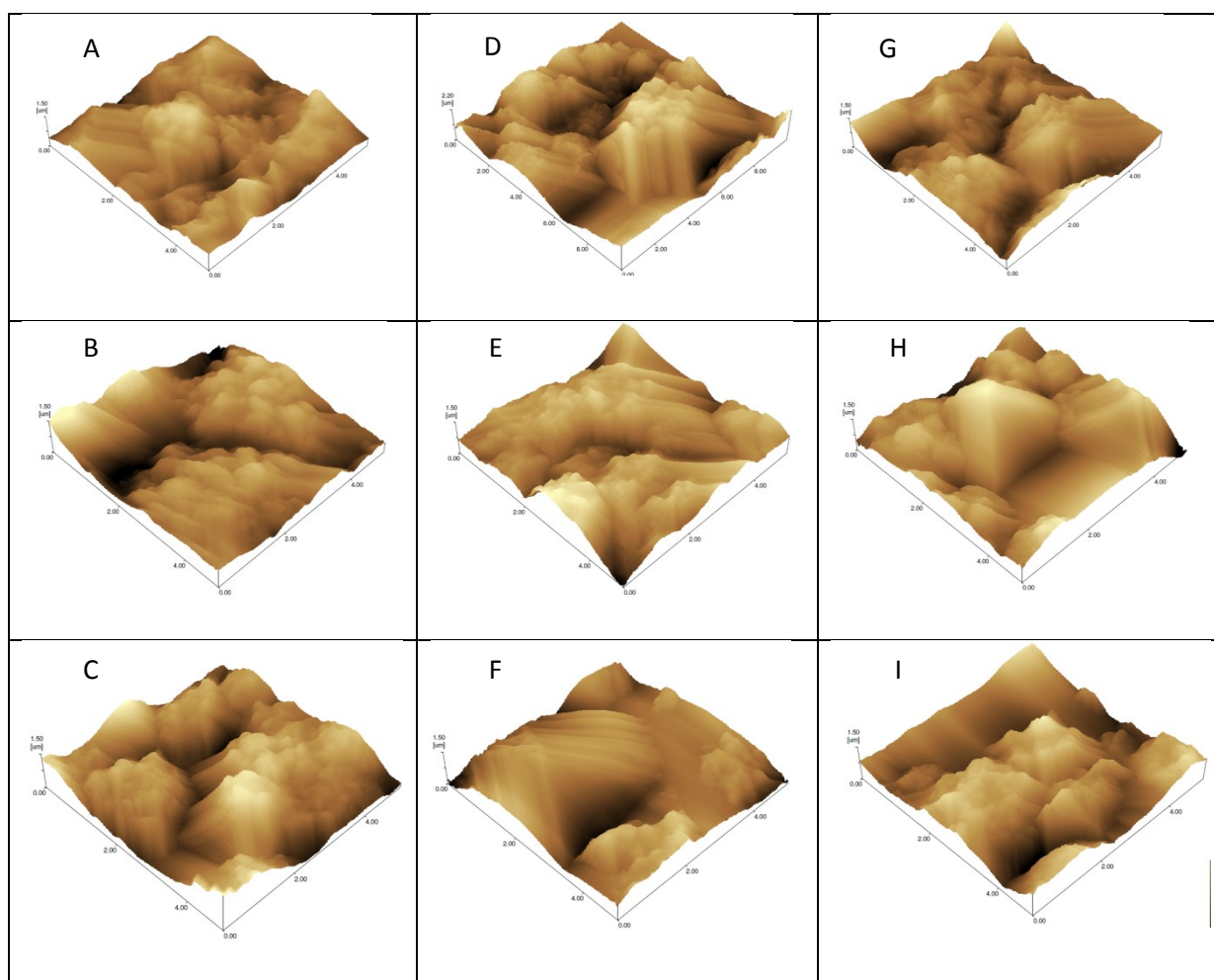


Figure 3: AFM topographical images of gold electrodes for detection of IgG with *Strongyloides stercoralis* antigens C10 (A, B, C), D3 (D, E, F), and Detergent Phase (G, H, I). Incubation with positive sera (A, D, G), negative sera (B, E, H), and sera from other parasitic diseases (C, F, I).

Table 2. AFM analyses specified by the Roughness coefficient (Rq) for antigen binding to patients' sera (IgG) from *Strongyloides* positive, negative, and other parasitosis.

<b>Antigen s</b>	<b>Bare Gold</b>	<b>Positive Serum</b>	<b>Negative Serum</b>	<b>Other Parasitosis</b>
<b>DP</b>	220	233.87 ± 22.29a	303.06 ± 23.09a	275.42 ± 5.26a
<b>C10</b>	230	187.06 ± 1.22a	192.28 ± 12.35a	274.96 ± 71.51a
<b>D3</b>	250	651.42 ± 13.58a	353.43 ± 3.81b	214.85 ± 26.81b

\* Rq's in the same line followed by the same letter are not statistically different (P>0.05).

When comparing the surfaces of the electrodes of the 3 groups, the D3 probe analysis showed increased roughness on seropositive group electrodes, and decreased Rq after the addition of positive sera to other parasites and negative ones. This result corroborates the voltammetry graphs in which the detergent fraction has little differentiation between the curves and, on the other hand, D3 exhibits the greatest differentiation between the G1, G2 and G3 groups. Thus, roughness can be considered to increase when positive serum antibodies are recognized with greater efficiency, in agreement with data published by (Santos *et al.*, 2012).

The difference in the roughness coefficient found in our experiments can be explained by the fact that the topography of adsorption and the interaction between biomolecules involved were determined by the composition, amino acid sequence of the peptide and affinity to the antibodies. These characteristics determine the position of the binding site within the peptide structure and the physic-chemical interactions between peptide and electrode surface and between the peptides themselves (hydrophobic interactions, hydrogen bonds, covalent bonds, electrostatic interactions) with additional influence of environmental conditions such as pH and ionic strength (Cecchet *et al.*, 2007; Humblot *et al.*, 2014).

Therefore, AFM images and results of electrochemical techniques used confirmed not only that the immobilization protocol was successful, but also the greater specificity and sensitivity of the D3 peptide.

#### **4. Conclusion**

Interesting platforms for diagnosis can be produced using the combination of biological materials and electrochemical sensors, provided that the probe structure used can be chemically or physically combined with the work electrode material of choice. In our study, we have shown that mimetic peptides of antigens may be efficiently substitute to extracts of parasite surface antigens for disease detection by electrochemical immunosensors.

The affinity between C10 and D3 peptide probes and the gold electrode constructed a stable platform for strongyloidiasis detection demonstrating the importance of the presence of amino acids that covalently combine to the electrode surface. Thus, Peptides obtained from Phage Display selections will not always be good probes for use in electrochemistry, needing the study of their amino acids to select the best electrode for attainment of the desired platform.

In this study, using nanoporous gold electrode and ferri / ferrocyanide as electrolyte at neutral pH, the D3 peptide showed the best results and a great potential for its use as recognition probe of strongyloidiasis positive serum. However, further studies are needed to determine the sensitivity of the test and its limits of detection or amplify this recognition.

#### **References**

ARAUJO, Galber R. et al. A novel reactive epitope-based antigen targeted by serum autoantibodies in oligoarticular and polyarticular juvenile idiopathic arthritis and development of an electrochemical biosensor. **Immunobiology**, v. 221, n. 5, p. 634-640, 2016.

BAERMANN, Gustav. Eine einfache methode zur auffindung von Ancylostomum (Nematoden) larven in erdproben. **Geneeskd Tijdschr Ned Indie**, v. 57, p. 131-137, 1917.

BELLUZO, María Soledad et al. Favorably orienting recombinant proteins to

develop amperometric biosensors to diagnose Chagas' disease. **Analytical biochemistry**, v. 408, n. 1, p. 86-94, 2011.

CECCHET, Francesca et al. Atomic force microscopy investigation of the morphology and the biological activity of protein-modified surfaces for bio-and immunosensors. **Analytical chemistry**, v. 79, n. 17, p. 6488-6495, 2007.

COLLINSON, Maryanne M. Nanoporous gold electrodes and their applications in analytical chemistry. **ISRN Analytical chemistry**, v. 2013, 2013..

DA SILVA, Herculano et al. The detergent fraction is effective in the detection of IgG anti-Strongyloides stercoralis in serum samples from immunocompromised individuals. **Parasitology international**, v. 63, n. 6, p. 790-793, 2014.

FELICIANO, Nágilla D. et al. Short epitope-based synthetic peptides for serodiagnosis of human strongyloidiasis. **Immunology letters**, v. 172, p. 89-93, 2016.

FELICIANO, Nagilla Daliane et al. Bacteriophage-fused peptides for serodiagnosis of human strongyloidiasis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 5, p. e2792, 2014.

FELICIANO, Nágilla Daliane et al. Hydrophobic fractions from Strongyloides venezuelensis for use in the human immunodiagnosis of strongyloidiasis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 67, n. 2, p. 153-161, 2010.

HUMBLOT, V. et al. Walking peptide on Au (110) surface: Origin and nature of interfacial process. **Surface Science**, v. 628, p. 21-29, 2014.

KOZLOWSKI, Lukasz P. IPC–isoelectric point calculator. **Biology direct**, v. 11, n. 1, p. 55, 2016.

KÜHNLE, Angelika et al. Growth of Unidirectional Molecular Rows of Cysteine on Au (110) – (1×2) Driven by Adsorbate-Induced Surface Rearrangements. **Physical review letters**, v. 93, n. 8, p. 086101, 2004.

LI, Xing-Hua et al. Ionic-Liquid-Doped Polyaniline Inverse Opals: Preparation, Characterization, and Application for the Electrochemical Impedance Immunoassay of Hepatitis B Surface Antigen. **Advanced Functional Materials**,

v. 19, n. 19, p. 3120-3128, 2009.

LUTZ, Adolpho. Schistosomum mansoni and Schistosomiasis observed in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 11, n. 1, p. 121-155, 1919.

MASEK, Anna; CHRZESCIJANSKA, Ewa; ZABORSKI, Marian. Estimation of the antioxidative properties of amino acids—An electrochemical approach. **Int. J. Electrochem. Sci**, v. 9, p. 7904, 2014.

MORAES, R. G. Contribuição para o estudo do Strongyloides stercoralis e da estrogiloidíase no Brasil. **Rev Serv Espec Saúde Pública**, v. 1, p. 507-624, 1948.

OLSEN, Annette et al. Strongyloidiasis—the most neglected of the neglected tropical diseases? **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, n. 10, p. 967-972, 2009.

PALAFIX-HERNANDEZ, J. Pablo et al. Comparative study of materials-binding peptide interactions with gold and silver surfaces and nanostructures: a thermodynamic basis for biological selectivity of inorganic materials. **Chemistry of Materials**, v. 26, n. 17, p. 4960-4969, 2014.

PUIU, Mihaela et al. A modular electrochemical peptide-based sensor for antibody detection. **Chemical Communications**, v. 50, n. 64, p. 8962-8965, 2014.

RIBEIRO, Vanessa S. et al. Detergent fraction of heterologous antigen to detect IgA and IgG in strongyloidiasis using saliva and serum paired samples. **Immunology letters**, v. 134, n. 1, p. 69-74, 2010.

SANTOS, Paula S. et al. Functional epitope core motif of the Anaplasma marginale major surface protein 1a and its incorporation onto bioelectrodes for antibody detection. **PLoS one**, v. 7, n. 3, p. e33045, 2012.

VELASCO-VELEZ, Juan-Jesus et al. The structure of interfacial water on gold electrodes studied by x-ray absorption spectroscopy. **Science**, v. 346, n. 6211, p. 831-834, 2014.

WANG, Lai-Hao; HUANG, Wen-Shiuan. Electrochemical oxidation of cysteine at a film gold modified carbon fiber microelectrode its application in a flow—through

voltammetric sensor. **Sensors**, v. 12, n. 3, p. 3562-3577, 2012.

WU, Jun et al. Development of a troponin I biosensor using a peptide obtained through phage display. **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 19, p. 8235-8243, 2010.

ZHONG, Guangxian et al. Sensitive electrochemical immunosensor based on three-dimensional nanostructure gold electrode. **International journal of nanomedicine**, v. 10, p. 2219, 2015.



**Artigo 2.**

**The redox property of 4-dimethylaminoantipyrine as a new electrochemical indicator for protein immunosensors**

**The redox property of 4-dimethylaminoantipyrine as a new electrochemical indicator for protein immunosensors**

Francielli C. C. Melo, Renata P. Alves-Balvedi, Ana Carolina Dias, Anderson L. Valle, Luciano P. Rodrigues, Luiz R. Goulart

*Institute of Biotechnology, Laboratory of Nanobiotechnology, Federal University of Uberlandia - Brazil.*

**\* Corresponding Authors:**

FCCM - francielli.melo@gmail.com; LRG - lrgoulart@ufu.br

**Conflict of Interests:**

The peptide sequences used for the proof-of-concept is part of the patent applications PI0903089-1A2 and BR1020140036369, and the new indicator is also part of the patent application BR1020160195390, which are all partially owned by the Federal University of Uberlandia.

## **Abstract**

Understanding the interfaces of materials is a central issue for the development of electronic devices. Here we describe a new interface mediated by 4-dimethylaminoantipyrine (4-DMAP), composed of benzene and pyrazole groups. Due to the association of benzene with graphite and the binding of pyrazole to proteins, this new indicator may be used in electrochemical immunoassays with different peptide or protein probes, using simple commercial screen-printed graphite electrodes. We have successfully demonstrated that 4-DMAP oxidation was used to amplify the specific biological recognition between epitope-based peptides and serum immunoglobulin G (IgG) from patients with leishmaniasis, strongyloidiasis and leprosy. We have also shown that 4-DMAP must be incorporated onto the electrode's surface prior to serum without any interference in the antibody affinity, and consequently on sensitivity and specificity. Additionally, 4-DMAP oxidizes at a low anodic potential, and its oxidation peak may be useful to detect proteins in biological fluids. This strategy is advantageous for the indirect detection of proteins that do not have electrochemical activities or are spatially inaccessible on the surface of the electrode. This new indicator opens a new way for immunosensors, especially for monitoring specific biological targets.

**Keywords:** Biosensor, 4-dimethylaminoantipyrine, electrochemical indicator, protein biosensor indicator, peptide probe, diagnosis.

## 1. Introduction

The electrochemical sensors have been object of intense research in recent years due to the range of possibilities of application in the diagnosis of infectious diseases (Rodvalho *et al.*, 2015).

Electrochemical indicators are commonly used in genosensors to mediate or display nucleic acids' hybridization processes. These compounds are mostly planar aromatic, and so there are several ways in which the compounds may interact with DNA by electrostatic interaction, groove binding and intercalation (Ferapontova, 2011). Many studies report useful DNA indicators, such as ethidium bromide, acridine orange, methylene blue, hematoxylin, Hoechst dye and tetramethylbenzidine (Alves-Balvedi *et al.*, 2016; Rodrigues *et al.*, 2015; Balvedi *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2012; Tran *et al.*, 2011; Nasirizadeh Izadeh *et al.*, 2011; Le Pecq and Paoletti, 1967; Waring, 1965). However, there are no electrochemical indicators that can designate biological recognition between proteins, a challenge that will be explored here.

The organic compound 4-dimethylaminoantipyrine (4-DMAP; 4-dimethylamino-2,3-dimethyl-1-phenyl- $\delta$ 3-pyrazolin-5-one) is an active pharmaceutical ingredient that has long been used as analgesic, antipyretic and anti-inflammatory drug (Deshmukhet *et al.*, 2015; Santos *et al.*, 2010). The 4-DMAP can oxidize or reduce depending on the conditions of the physiological systems, leading to the formation of radical that seems to have high toxicity to the human body (Santos *et al.*, 2010; Malvar *et al.*, 2014).

Similarly, to 4-DMAP, the 4-aminoantipyrine (4-AA) and 4-methylaminoantipyrine (4-MAA) are active metabolites with antipyretic action, that have affinity for biomolecules as dipyrone has (Malvar *et al.*, 2014; Levy *et al.*, 1995). It is expected that the toxic analogue 4-DMAP may also presents similar affinity to organic compounds due to its structure containing a pyrazole group (Figure 1). We hypothesized that the binding affinity of 4-DMAP to proteins coupled with its redox properties may be important traits to be considered as a new indicator for electrochemical immunosensors.

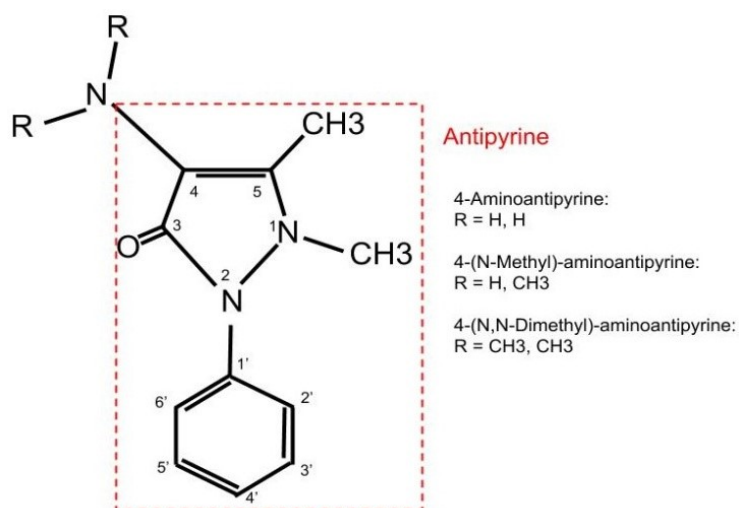


Figure 1. Scheme demonstrating the basic structure of antipyrine and its possible derivations (Source: Santos *et al.*, 2010).

In this investigation, the oxidation of 4-DMAP was used as electrochemical indicator enabling the recognition of the epitope-based peptides and immunoglobulin G (IgG), in a voltammetry study. We believe that 4-DMAP is the first electrochemical indicator for use in immunosensors that use proteins or peptides as a recognition probe.

## 2. Experimental Section

### 2.1. Chemical and biological reagents

All reagents used were of analytical grade without further purification. All experiments were conducted at room temperature ( $25 \pm 1$  °C). Ultrapure (Type 1) Water Quality (Direct-Q®3 Water purification System, Merck Millipore) was used for the preparation of aqueous solutions. Phosphate buffer (PB) solution  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  was prepared at pH 7.4. Stock solutions of the probe (peptide), target (serum), block solution (BSA 0,5%) were prepared in PB and stored in a freezer until use. The new electrochemical indicator, 4-dimethylaminoantipyrine (4-DMAP), was prepared in water ( $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) and stored in 4°C in an amber bottle (to prevent degradation by UV radiation) until use. Due to the non-interference in the three-dimensional conformation of the probes, we chose to maintain the solutions at physiological pH.

For specific biological recognition we use four peptides related to neglected diseases with different etiological agents: protozoa, nematoda and

bacterium. These peptides were based on epitopes originated from phage display selections that mimic highly specific antigens of the target pathologies, with probes being Visceral Leishmaniasis - LC1 (*Leishmania infantum chagasi*) and Tegumentary Leishmaniasis - LT (*Leishmania amazonensis*) (Goulart *et al.*, 2008), D3 for Strongyloidiasis (*Strongyloides stercoralis*; Feliciano *et al.*, 2014) and M3R for Leprosy (*Mycobacterium leprae*; Goulart *et al.*, 2014), and chosen based on previous diagnostic parameters obtained in serological tests (ELISA), which detected IgG in serum samples from patients (Feliciano *et al.*, 2014; Feliciano *et al.*, 2016; Ramos *et al.*, 2017; Costa *et al.*, 2017; Salgado *et al.*, 2018). Negative and positive sera were confirmed by the gold standard assay. The ratio of probe and target titers used in the ELISA immunoassay previously were calculated and maintained (Table 1).

Table 1. Target diseases, probes ID and concentrations, serum dilution, and specific references for each probe.

Probe ID	Probe Concentration	Target Disease	Serum dilution	References
LC1	38 µg/mL	Visceral Leishmaniasis	1:100	Goulart <i>et al.</i> , 2008
LT	22,5 µg/mL	American Tegumentary Leishmaniasis	1:100	Goulart <i>et al.</i> , 2008
D3	4 µg/mL	Strongyloidiasis	1:160	Feliciano <i>et al.</i> , 2014
M3R	3.53 µg/mL	Leprosy	1:100	Goulart <i>et al.</i> , 2014

\*Institutional Research Board (UFU), number of the protocol and date.

## 2.2. Electrochemical Apparatus

Electrochemical voltammetric measurements (Differential Pulse Cycle) were performed using the potentiostat PalmSens 3 (PalmSens Compact

Electrochemical Interfaces, Houten, The Netherlands), and screen-printed electrodes (DropSens, Asturias, Spain) in ceramic substrate: L33 x W10 x H0.5mm.

The electrochemical screen-printed electrodes consisted of working electrode (4 mm diameter), counter electrode and reference electrode, with the following formats: type 1 - carbon, carbon, silver (DropSens, Spain; ref. C110), and type 2 – gold, gold, silver (ref. BT 220). The basic parameters used for the readings were: modulation amplitude (pulse E): 0.015mV; pulse interval (pulse t): 0.06s; scanning rate: 15 mV.s<sup>-1</sup> (0.002V step); current range 1nA to 10mA, time equilibration 2s, potential -0.2V to 0.9V.

### *2.3. Conjugation of the probe and electrochemical measurements*

Two (2)µL of the probes were applied to the surface of the working electrodes and incubated for 30 minutes at room temperature. The electrode was then washed with one thousand (1,000) µL of phosphate buffer saline and dried in manual air insufflator equipment. 2µL of BSA 0.5% for 20 minutes was required to block the binding of nonspecific biomolecules. Then, the electrode was washed again with 1000µL of phosphate buffer and dried in the same manner as the first step. The correct order for incorporation of the indicator (4-DMAP) was tested in the following order: before adding serum and after inclusion of the serum of patients. Two (2)µL of 4-DMAP were applied onto the electrode's surface for 20 minutes, and the probe binding its interaction was evaluated by differential pulse voltammetry (DPV). DPV measurements in electrode connected to a potentiostat were obtained by using 100µL of phosphate buffer at pH 7.4 as electrolyte to evaluate the electrochemical sign (indirect detection). All electrochemical tests were performed in triplicate. The incubation periods were performed in the absence of light at room temperature.

### *2.4. Immunosensing tests*

We used sera from infected patients to demonstrate the specific peptide-IgG complex (target probe) link. After immobilization of the probes on working electrode surface, 2µL of serum was applied to the carbon work surface for 20 minutes at room temperature. Then, the electrode was washed with 1000µL with phosphate buffer and dried.

In the first test, not yet using 4-DMAP, the measurements of DPV were obtained using 100 $\mu$ L of  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$  and 0.1M KCl, pH 7.0, as electrolyte to evaluate the electrochemical sign. In the functionalization for 4-DMAP test, when serum was added after or before this indicator, we used phosphate buffer (pH 7.0) as electrolyte. The negative control was performed using negative newborn serum for the pathologies studied.

The best results for probe LC1 were repeated using different probes to confirm the biological recognition and action of 4-DMAP as electrochemical indicator.

### *2.5. Atomic force microscopy (AFM) topographical analysis*

Atomic force microscopy (AFM) imaging was assessed (SPM 9600, Shimadzu) to determine topographical changes in the electrodes' surface pre- and post-immunoagglutination complex formation. Analyses of rugosity (Rq) were performed on bare graphite electrodes (C110), C110 electrodes with 4-DMAP, C110 electrodes functionalized with the LC1 peptide, followed by incorporation of 4-DMAP, and then LC1+4-DMAP with positive IgG sera, and LC1+4-DMAP with negative IgG sera.

## **3. Results and Discussion**

### *3.1 Electrode material and electrochemical indicator*

According to Santos *et al.* (2010), under suitable reaction conditions 4-DMAP can form hydroxylated derivatives, by addition of hydroxyls to the aromatic ring, and oxidative demethylation, converting to 4-methylaminoantipyrine and 4-aminoantipyrine sequentially when in a buffered saline solution. The oxidation of 4-DMAP is dependent on the pH of the solution, being accelerated by pHs closer to the neutrality. This is an important feature that gives 4-DMAP new possibilities of interaction with biomolecules.

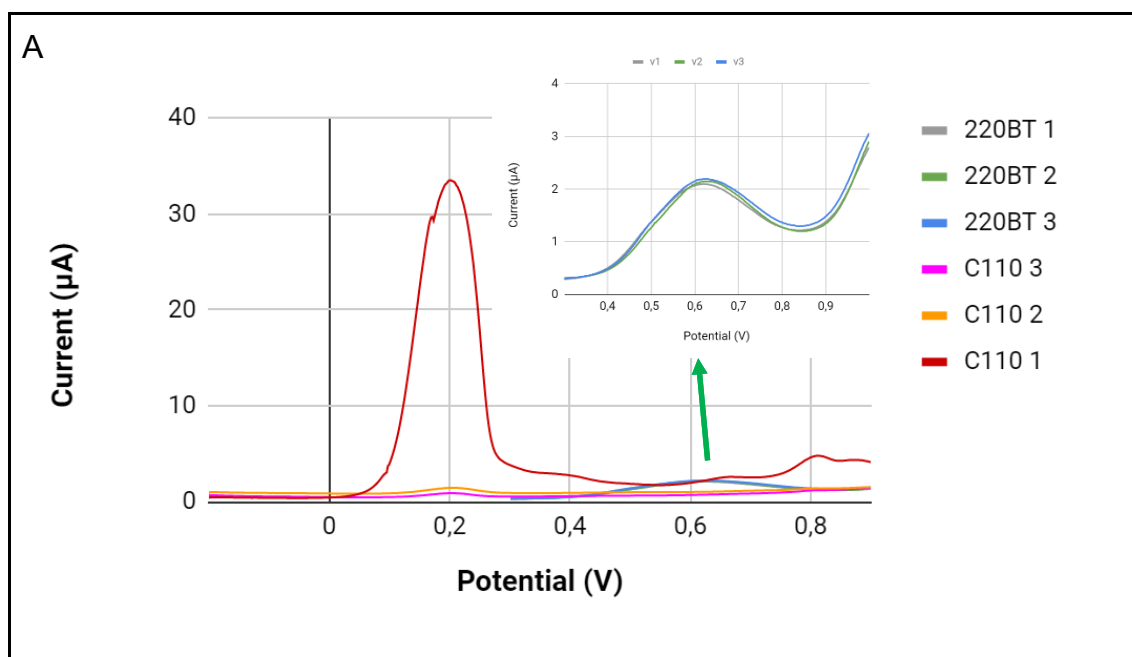
The four first scans of 4-DMAP differential pulse voltammograms embedded in the carbon and gold electrode surfaces, respectively, are shown in Figure 2 (A and B). The 4-DMAP was fully oxidized at the potential of 0.2V at the first sweep of the electrode of graphite. A different behavior was observed in the gold surface, where we can observe a little gradual oxidation in a higher anodic potential of 0.63V in four scans.



The 4-DMAP did not interact well with the gold surface, presenting a more effective adsorption on the carbon surface, possibly due to carbon interactions with the nitrogen of the amine group and Van der Waals interactions with the aromatic rings. For this reason, the other tests of this study were carried out on a graphite electrode.

Gowda *et al.* (2015) evidenced the same behavior for 4-aminoantipyrine on surface electrodes modified with multiwalled carbon nanotube in cyclic voltammetry. The 4-AAP completely and irreversibly oxidized at the potential of 0.512V. The author attributed the complete oxidation to the large surface area of his modified electrode.

After the choice of the best electrode to be used in this platform, we verified the electrochemical behavior of the LC1-target probe reaction using as supporting electrolyte the aqueous solution of  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$  and 0.1M KCl, pH 7.0, due to its known redox capacity. Figure 2B shows the reading in cyclic voltammetry (and a Ferro-Ferricyanide redox couple reference signature in differential pulse voltammetry) of the probe specific for visceral Leishmaniasis linked with positive and negative controls.



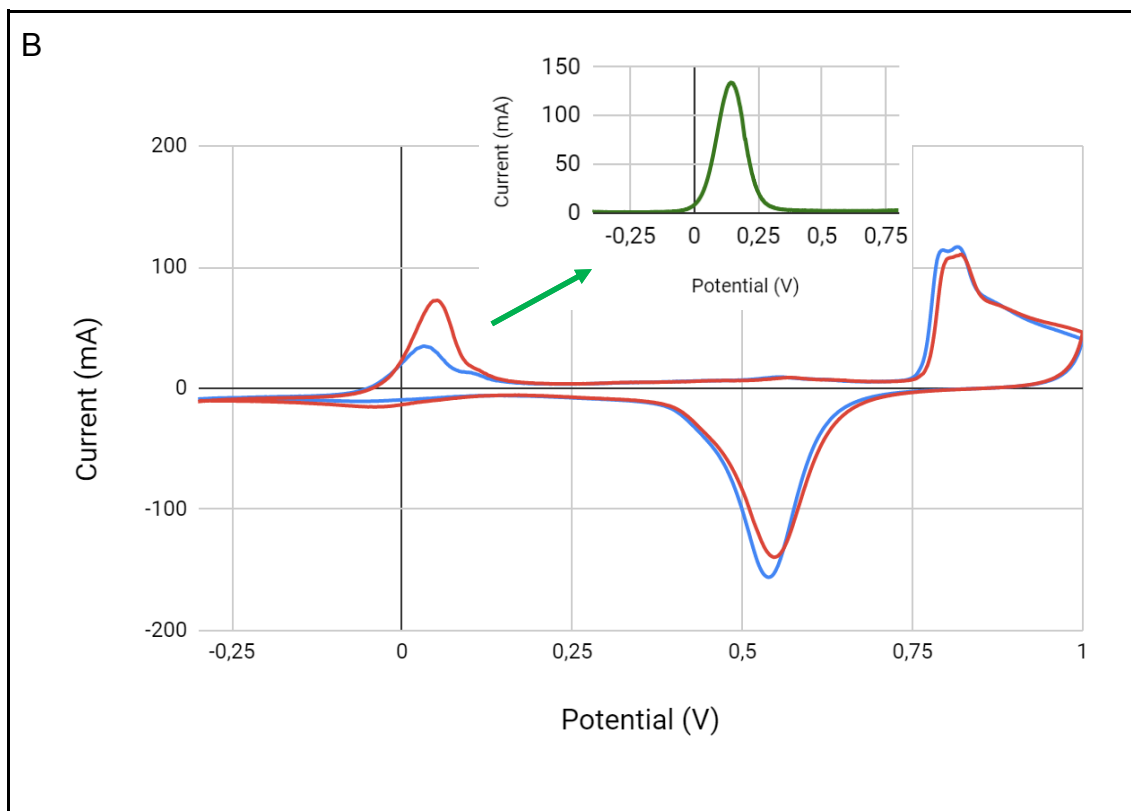


Figure 2. DPV for the first three scans of the 4-DMAP ( $5 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) on the screen-printed graphite electrode C110 and gold electrode screen printed BT220 (A) in electrolyte phosphate buffer saline (pH 7.4); and cyclic voltammetry of target probe reaction LC1 Peptide - IgG anti L chagasi, on graphite electrode C110 and electrolyte  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  and  $0.1 \text{ M KCl}$ , pH 7.0 (B): red - positive serum (peak  $72.62\mu\text{A} \pm 2.5$ ;  $0.05\text{V}$ ); blue - negative serum ( $33.63\mu\text{A} \pm 1.2$ ;  $0.04\text{V}$ ). Green (out of graph) demonstrates the oxidation of the Ferro-ferricyanide, with no other components added.

### 3.2. Assembly of bioelectrodes and importance of the immobilization sequence of 4-DMAP on the surface for detection

Recognition surface functionalization begins after immobilization of the visceral leishmaniasis antigen mimetic peptide (LC1) in the corresponding area to the working electrode (C110). Immediately thereafter, blocking age of free sites on this surface with the addition of bovine serum albumin (BSA) was performed, avoiding nonspecific binding. We incorporated the 4-DMAP into two different biosensor mounting conditions: before adding serum and after inclusion of serum. The best conditions for recognition of IgG positive sera were obtained when 4-DMAP was added prior to the introduction of the sera, demonstrating more significant differences between serum-positive and controls (serum-negative and peptide alone / other pathologies), and also larger anodic peaks. Comparative

indirect detection tests with 4-DMAP incorporated before or after serum showed significant differences in electrochemical results (Figure 3).

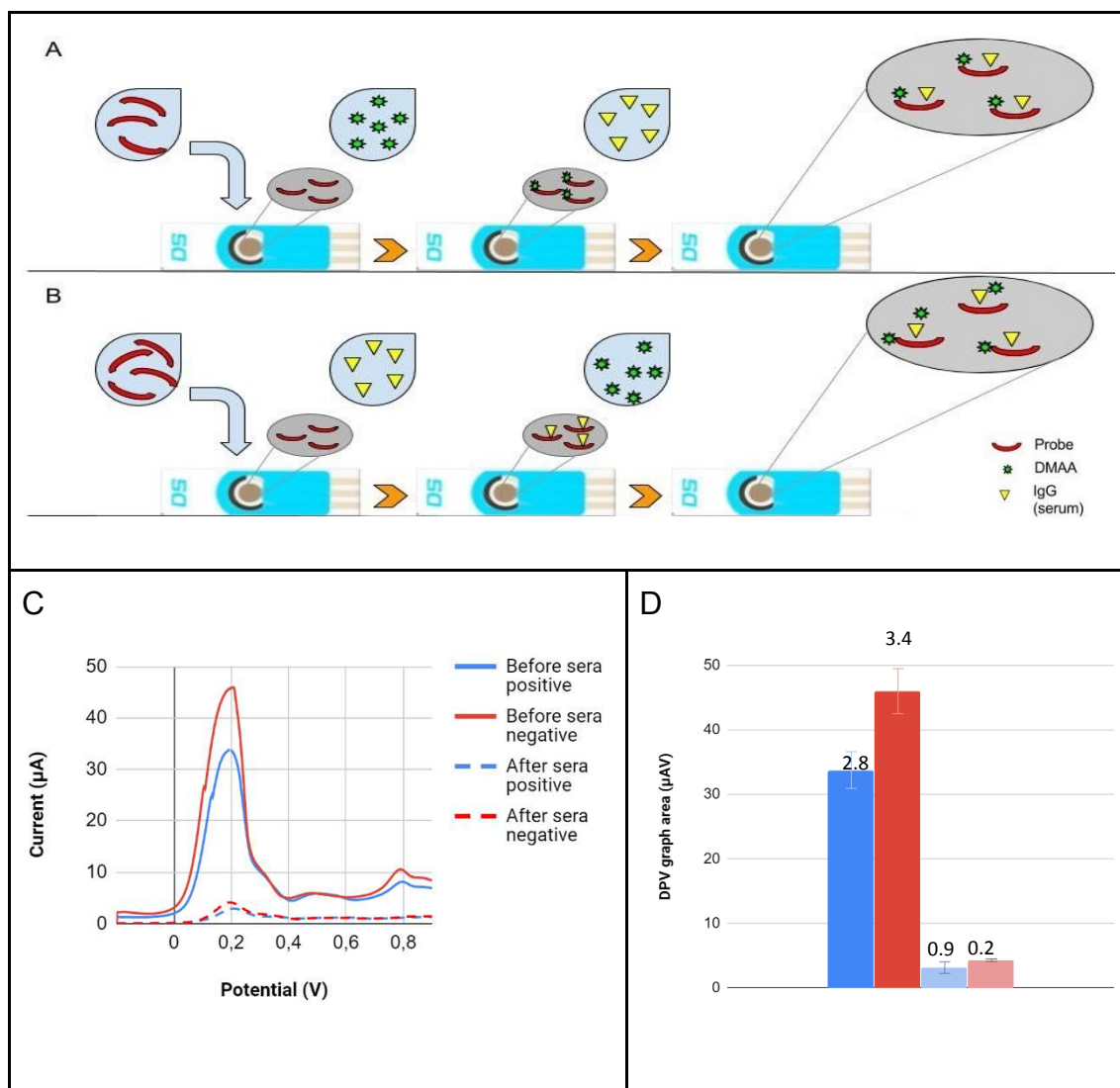


Figure 3. Electrochemical results of differential pulse voltammetry (DPV) for Leishmaniasis detection using the LC1 peptide and 4-DMAP in two different moments of the functionalization of the electrodes' surfaces. A – scheme of functionalization using 4-DMAP before serum; B – scheme of functionalization using 4-DMAP after serum; C – DPV peaks:  $45.96\mu\text{A} \times 0.20\text{V}$ ;  $33.73\mu\text{A} \times 0.19\text{V}$ ;  $4.12\mu\text{A} \times 0.19\text{V}$ ;  $2.92\mu\text{A} \times 0.21\text{V}$ ; and D – DPV graph area (numbers on top of histogram boxes are standard deviation values). Electrolyte: phosphate buffer saline (pH 7.4).

We note that the amplitude of 4-DMAP oxidation peaks increases by more than 10 times when we compared functionalization with addition of 4-DMAP after and before sera ( $45 \times 4.2\mu\text{A}$  for serum-negative, and  $32 \times 2.5\mu\text{A}$  for serum-positive) (Figures 4A and 4B). This difference is an evidence of indicator

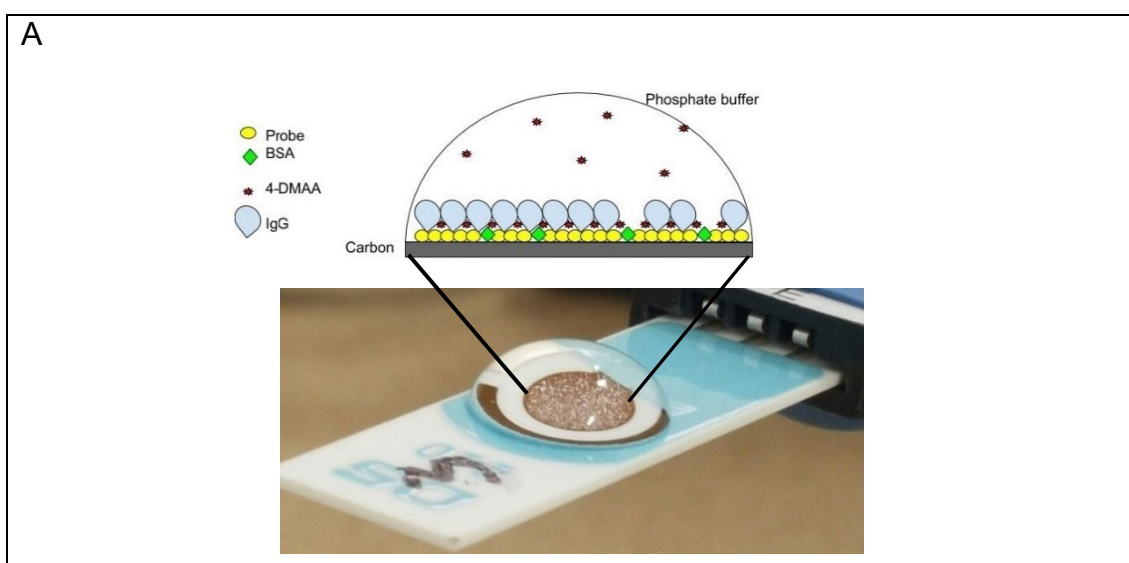
predilection for the first biomolecules added to the carbon surface (peptide and BSA) and the weak interaction with the IgGs and other components of the serum. In this case, the final electrode wash before voltammetry in phosphate buffer would remove much of the 4-DMAP deposited as the last step of the functionalization. It's not occurred when added after the probe and the blocker. Therefore, insertion of 4-DMAP prior to the addition of serum into the system was considered the best test condition for use in subsequent assays.

Gowda *et al.* (2014) demonstrated that the electrochemical signal in cyclic voltammetry and the intensity of fluorescence of human albumin (HSA) decreased according to the increased concentration of amino antipyrine (AA), with greater disturbance of tryptophan, indicating a connection between 4-AA and HSA. Teng *et al.*, (2011) propose that the interaction between BSA and AA occurs in negatively charged amino acid residues, such as Glu and Asp, through electrostatic and van der Waals forces. Teng *et al.* also proposed in 2010 that in addition to the van der Waals forces, hydrogen bonds are also involved in AAP-protein interaction, in this case hemoglobin, which is a blood metalloprotein. Other supporting evidence was provided by molecular coupling and dynamics studies, which are high affinity between the pyrazole groups and as proteins (Jagadeesan *et al.*, 2015). The first peptide used, LC1, shows negative electric charge (-2) at neutral pH, with isoelectric point at 4.04. In its structure, two glutamates and one aspartate are presented, corroborating with the dynamics of the 4-DMAP amino antipyrine.

In a study that shows immunological detection of C-reactive protein using amino antipyrine as electrochemical indicator, the authors propose that this indicator intercalates in amino acid aromatics by Van der Waals forces in proteins (Lemos *et al.*, 2018). Therefore, we can conclude that there is a good interaction of 4-DMAA with peptide probes and also with the BSA used in the block of nonspecific binding. In addition, the specific target recognition reaction by the probe probably altered the electron passage dynamic at the electrode surface, generating a significant reduction of the current in the system, which did not occur in the voltammetric readings of negative sera, which showed current peaks higher than positive sera. Figure 4A demonstrates the theory of trapping the electrochemical indicator between probe / blocker and target, causing an

insulating effect that reduces the oxidation of the electrochemical indicator. The absence of the reaction in negative sera exposes the 4-DMAP adsorbed on the peptide and the BSA, generating larger anodic peaks.

When we observe the individual result graph of each stage of adsorption, we can verify the electrochemical role of each component in the VPD curves obtained from the experiments (Figure 4B). The probe LC1 (green line) in the absence of 4-DMAP maintains a very low current reading near the baseline (phosphate buffer), defining the probe as non-electron donor element for the system, or even hindering electric current (Herzog and Arrigan, 2007, Masek *et al.*, 2014). Although it is negative at neutral pH (-2), the peptide in question has a significant number of hydrophobic amino acids that may further hamper the passage of electrons through the working electrode. 4-DMAP, on the other hand, favors the flow of electrons, showing a peak current 30 times higher than the probe reading (orange line). When this is deposited on the probe and blocker (red line), an oxidation peak appears between the pure 4-DMAP and the peptide probe, indicating its adsorption at the carbon surface. When the sera are added, the peaks of anodic current decrease even more, proving the interference of the target-probe reaction in the oxidation of our electrochemical indicator, as already discussed. Even in the oxidation curve of the negative serum control, there is a decrease in peak amplitude, indicating that some non-specific interaction still exists on the surface of the system, despite the blocking and washing steps used.



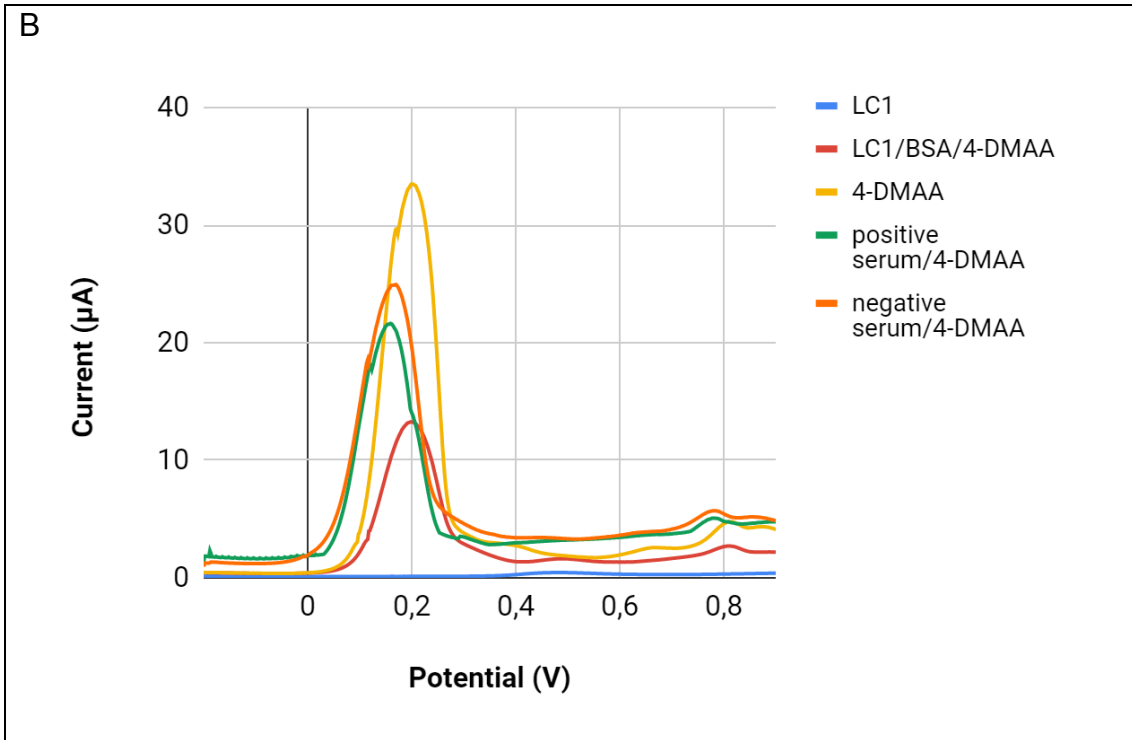
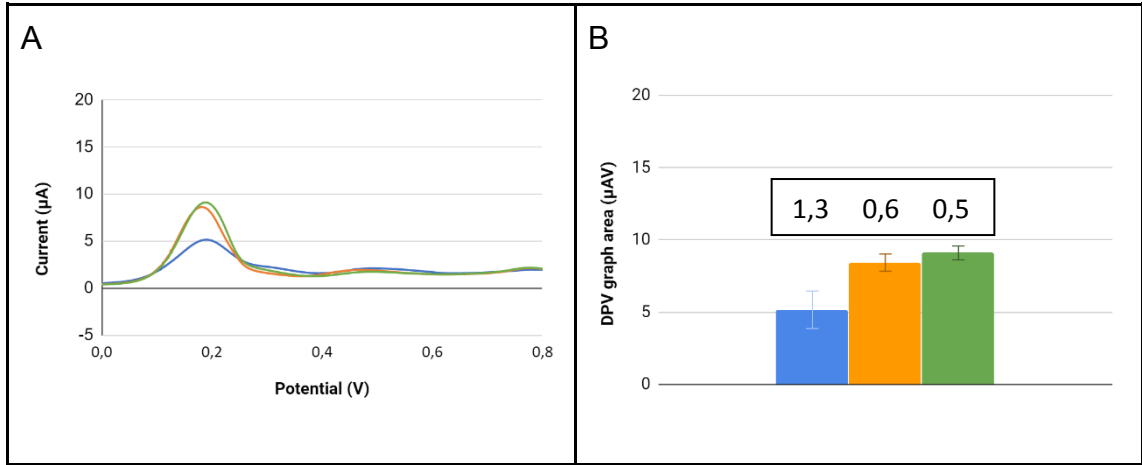


Figure 4. Stages of adsorption in sequential steps functionalization showing the DPV curves of each component added to the system. Peak values for 4-DMAA:  $33.50\mu\text{A} \times 0.20\text{V}$ , negative serum/4-DMAA:  $24.95\mu\text{A} \times 0.17\text{V}$ , Positive serum/4-DMAA:  $21.60\mu\text{A} \times 0.16\text{V}$ , LC1/BSA/4-DMAA:  $13.25\mu\text{A} \times 0.19\text{V}$ , LC1:  $1.61\mu\text{A} \times 0.5\text{V}$ . Electrolyte: phosphate buffer saline (pH 7.4).

3.3 Affinity of 4-DMAP by different peptide probes

When using this test condition for adsorption ordering steps in different peptide probes, we find that 4-DMAP again succeeds in differentiation between the target-probe recognition (D3-specific IgG strongyloidiasis peptide) and the non-recognition of negative sera and other parasites by the probe. The same occurred for the LT recognition probe, according to Figure 5.



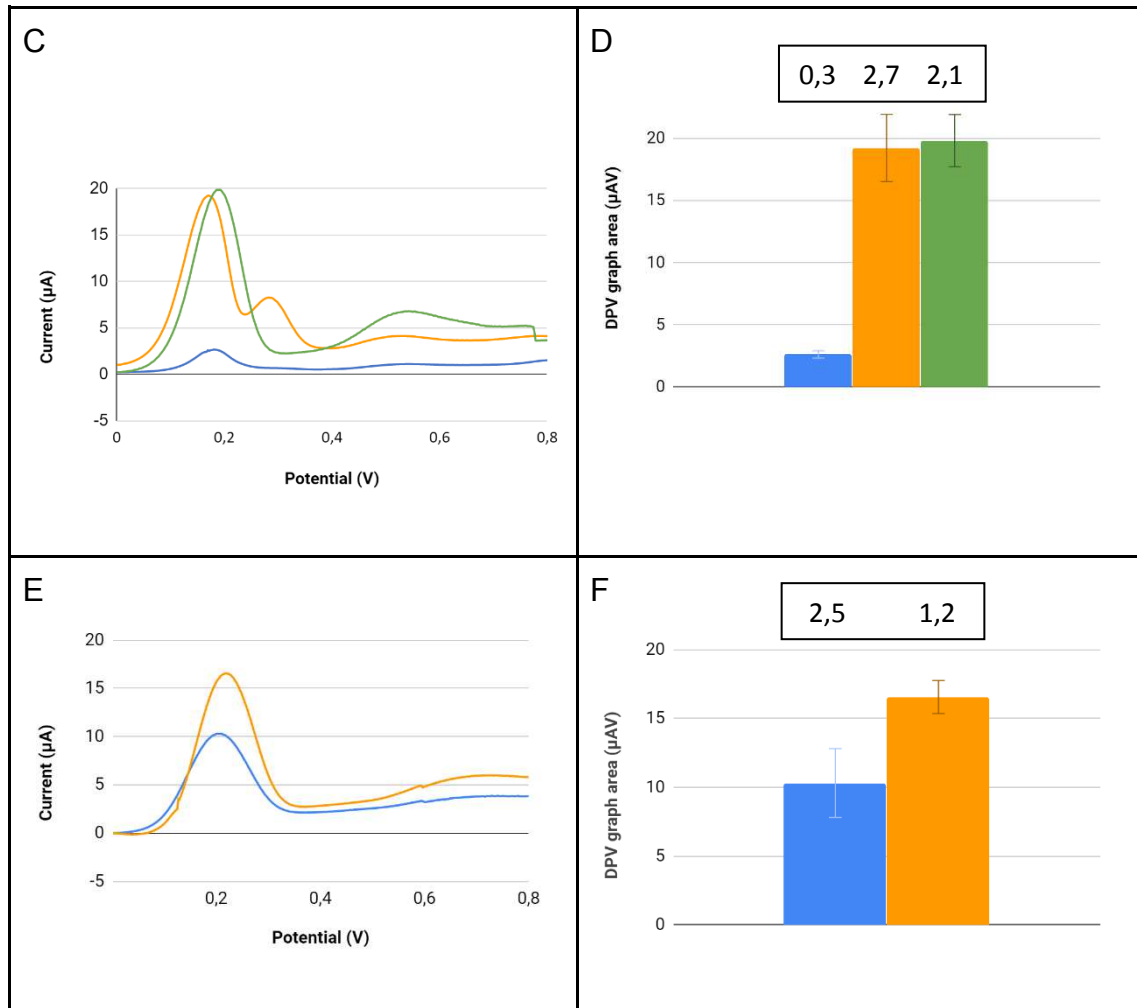


Figure 5. Results of the differential pulse voltammetric readings using 4-DMAP before serum: A and B - Strongyloidiasis probe D3 (peaks 9.09, 8.91 and 5.15 $\mu$ A); C and D - tegumentary leishmaniasis probe LT (peaks 19.84, 19.14 and 2.62 $\mu$ A); E and F - Leprosy probe M3R (peaks 16.55 and 10.30 $\mu$ A). Bars: blue = positive serum, yellow = negative serum, and green = controls (the control was absent in F). Graphs showing current range -5 to 20 $\mu$ A and potential 0 to 0.8V (same scale for all probes). Electrolyte: phosphate buffer saline (pH 7.4).

It is noted that the concentration of the probes D3 and LT interferes with anodic oxidation peaks intensity of 4-DMAP obtained in differential pulse voltammetry. For the lower concentration probes the total oxidation of this indicator occurred in smaller currents, perhaps due to the smaller amount of 4-DMAP adsorbed in the system, evidencing the need for higher probe concentrations for better fixation of the electrochemical indicator and consequent better detection of the IgGs under study. The LT and D3 probes have 24 amino acid residues and have a near zero charge at neutral pH (LT = 0; D3 = -0.3), whereas the M3R probe is a 77 amino acid residue protein negative charged (-1.7 at neutral pH), which prevents a better comparison with the results of the

other probes. Although its concentration is the smallest among the probes studied, so its size was probably an important factor in the immobilization of a good amount of the 4-DMAP indicator to obtaining satisfactory anodic peaks in the identification of antibodies to *M. leprae*.

Enache and Oliveira-Brett (2013), in an oxidation study of a specific peptide in carbon electrodes, evidencing the oxidation of the amino acids Tyrosine, Tryptophan, Histidine, Cysteine and Methionine, being the first oxidation of Tyrosine and Tryptophan residues, followed by oxidation of Histidine, and thereafter a half of benzene tryptophan residues electrochemical hydroxylation. Only the M3R protein presents a satisfactory amount of these amino acids to maximize the anodic peak of DMAP. However, these amino acids have several oxidation windows, and the results obtained with 0.2 V potential oxidation could only be related to the oxidation of poly-tyrosine and poly-tryptophan, 8 residues of M3R structure.

Moreover, using 4-DMAP as an electrochemical indicator, we could observe only the oxidation potential of this in 0.2 V, corresponding probably to the oxidation of the nitrogen of the substituent group "N, N-dimethyl", potential not described in the literature for this substance.

Hu *et al.* (2010) described two anode peaks for 4-aminoantipyrine in cyclic voltammetry: 0.56V and 0.94V (on carbon glass electrode, ranging to 0.52 and 0.91 on carbon nanotube electrodes), which correspond to the oxidation of the -NH<sub>2</sub> group and the antipyrine, respectively.

Based on these data and our results, the interaction of 4-DMAP with the peptide probes probably occurs in the region of the pyrazole aromatic ring, so we did not identify in the voltammetric tests any anode peak at 0.9V corresponding to the pyrazole oxidation. The same occurs for the oxidation potential at 0.6V, described for the amine radical, which also could not be seen in these results. We believe that this favorable potential in 0.2V refers to the oxidation of Nitrogen in the substituent group Dimethylamine present in 4-DMAP (absent in the AAP) and that the absence of the other oxidation potentials found in AAP are due to the interactions of pyrazole group and aromatic rings with the adsorbed biomolecules and the graphite sensing layer, respectively (Luong *et al.*, 2009),



which would also explain the oxidation potentials of 4-DMAP in the 0.7 V range seen in our experiments with a gold electrode.

### *3.4. Topographic analysis AFM*

The superficial analyzes of the C110 electrode with the best assembling strategy performed for probe 1 (specific visceral leishmaniasis) are shown in Figure 6. The addition of 4-DMAP on the graphite surface (Fig. 8B) and electrode previously functionalized with the peptide probe (Fig. 8C), produced a decrease in height and size of agglomerates, characterizing the reduced roughness when compared to the virgin C110 electrode Fig. 8A), suggesting that the indicator and the peptide are filling the cavities formed on the surface of the graphite. Interestingly, the best reduction in graphite surface roughness was observed when 4-DMAP was incorporated alone, suggesting a better planar interaction with the electrode. After adding the positive serum (Fig. 8D), the roughness increased significantly ( $R_q = 165.73$ ) with a globular appearance when compared to the negative serum ( $R_q = 60.11$ , Fig. 8E), showing the occurrence of agglutination between probe and specific IgG.

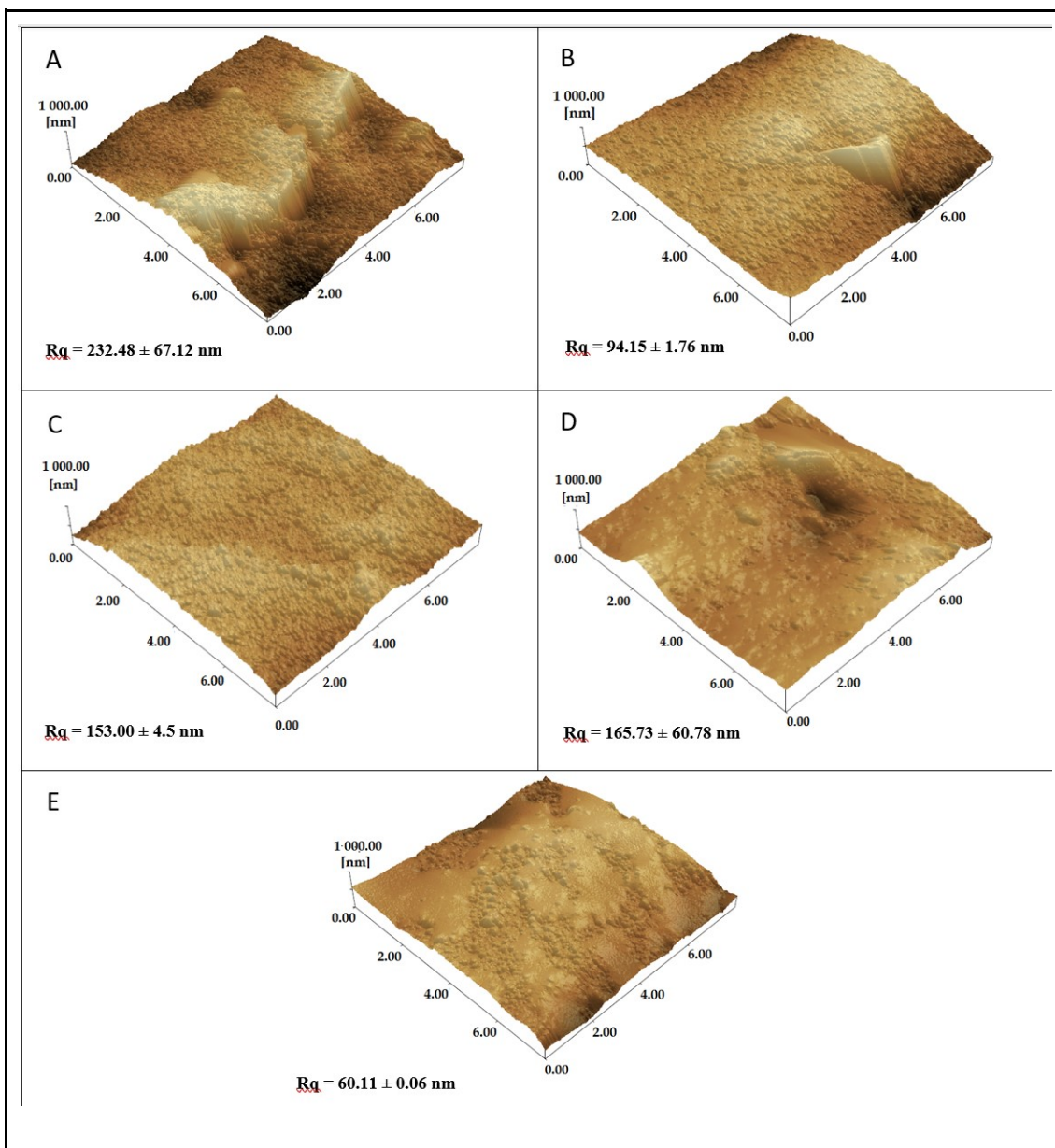


Figure 6. Atomic force microscopy images (AFM) of the graphite electrode (C110) (A); 4-DMAP added to C110 (B); LC1 added to C110 followed by 4-DMAP (C); LC1 + 4-DMAP with positive IgG serum (D); LC1 + 4-DMAP with negative IgG serum (E).  $R_q$  equivalent to roughness values.

#### 4. Conclusion

The results showed that 4-dimethylaminoantipyrine is a novel and versatile electrochemical indicator for immunosensors based on synthetic peptides and carbon / graphite electrodes. This is explained by its easy adsorption on this surface through the amino groups and the aromatic ring, which also connects to proteins through electrostatic and Van der Waals forces. 4-DMAP oxidizes its methyl groups to low anodic potential and the peak oxidation intensity may be

useful for detecting serum immunoglobulins and proteins in other biological fluids. This study showed that the incorporation of 4-DMAP in the electrode before serum IgG allowed the detection of the antigen-antibody reaction of interest in four different probes. The sensor response was primarily dependent on probe concentration when compared to peptides of the same amount of amino acids (24 amino acid residues), but the size of the protein molecule used as a probe influenced the intensity of the anode peaks exhibited in the DPV.

Although we have not evaluated the influence of pH on the system, we believe that little can be done in this sense, considering the possibility of conformational changes of the probes with pH variation that could be incompatible with the preservation of the recognition sites. We also used probes previously constructed to recognize specific antibodies in patient sera, but not designed specifically for use in electrodes and electrochemical studies. However, the method used to obtain these probes, the phage display, allows us to produce probes with specific sequences to facilitate the adsorption process on the surface of the working electrode, producing greater homogeneity in the results and consequent greater sensibility in the detection. This method will be the subject of future studies for the development of new electrochemical systems.

Therefore, 4-DMAP can be used as a universal indicator for immunoassays based on amino acid polymers (peptides and proteins). We emphasize that in our study there were no pre-treatments of the surface of the working electrode, and that this tool also can be used in future studies to improve the response of this method to the detection of diseases.

### **Acknowledgments**

The authors are grateful for the financial support of the funding agencies of Brazil: The State of Minas Gerais Research Foundation (FAPEMIG), the National Council for Economic and Technological Development (CNPq) and the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES).

## References

ALVES-BALVEDI, R. P. et al. Use of 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine as new electrochemical indicator of DNA hybridization and its application in genosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 85, p. 226-231, 2016.

BALVEDI, Renata et al. Detection of a specific biomarker for Epstein-Barr virus using a polymer-based genosensor. **International journal of molecular sciences**, v. 15, n. 5, p. 9051-9066, 2014.

COSTA, Lourena E. et al. Antigenicity of phage clones and their synthetic peptides for the serodiagnosis of canine and human visceral leishmaniasis. **Microbial pathogenesis**, v. 110, p. 14-22, 2017.

DAI TRAN, Lam et al. Electrochemical detection of short HIV sequences on chitosan/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticle based screen printed electrodes. **Materials Science and Engineering: C**, v. 31, n. 2, p. 477-485, 2011.

DESHMUKH, Priti et al. 4-Aminoantipyrine: a significant tool for the synthesis of biologically active Schiff bases and metal complexes. **Int J Pharm Sci Rev Res**, v. 34, n. 1, p. 162-170, 2015.

E FERAPONTOVA, Elena. Electrochemical indicators for DNA electroanalysis. **Current Analytical Chemistry**, v. 7, n. 1, p. 51-62, 2011.

ENACHE, T. A.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. Peptide methionine sulfoxide reductase A (MsrA): direct electrochemical oxidation on carbon electrodes. **Bioelectrochemistry**, v. 89, p. 11-18, 2013.

FELICIANO, Nágilla D. et al. Short epitope-based synthetic peptides for serodiagnosis of human strongyloidiasis. **Immunology letters**, v. 172, p. 89-93, 2016.

FELICIANO, Nagilla Daliane et al. Bacteriophage-fused peptides for serodiagnosis of human strongyloidiasis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 5, p. e2792, 2014.

Goulart, L.R., Cardoso, R., Almeida, J.F., Messias, F.F., Capparelli, F.E., Madurro, A.G.B., Madurro, A.G.B., Prudêncio, C.R., de Souza, G.R.L., Freschi, A.P.P., 2008. Peptídeos recombinantes e motivos proteicos miméticos a antígenos de *Leishmania* e suas aplicações. Patent application No. PI 0903089-1 A2, filed on August 12<sup>th</sup>, 2008.

Goulart, L.R., Lima, M.I.S., Nahas, A., Oliveira, J.D.D., Lobato, J., Goulart, I.M.B., 2014. Peptídeos recombinantes miméticos de antígenos de *M. leprae* e suas aplicações diagnósticas e imunogênicas. Patent application BR 10 2014 003636 9 filed on February 17<sup>th</sup>, 2014.

GOWDA, Jayant I.; BUDDANAVAR, Arunkumar T.; NANDIBEWOR, Sharanappa T. Fabrication of multiwalled carbon nanotube-surfactant modified sensor for the direct determination of toxic drug 4-aminoantipyrine. **Journal of pharmaceutical analysis**, v. 5, n. 4, p. 231-238, 2015.

GOWDA, Jayant I.; NANDIBEWOR, Sharanappa T. Binding and conformational changes of human serum albumin upon interaction with 4-aminoantipyrine studied by spectroscopic methods and cyclic voltammetry. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 124, p. 397-403, 2014.

HERZOG, Grégoire; ARRIGAN, Damien WM. Electrochemical strategies for the label-free detection of amino acids, peptides and proteins. **Analyst**, v. 132, n. 7, p. 615-632, 2007.

HU, Xinyue et al. UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> degradation of 4-aminoantipyrine: a voltammetric study. **Chemical Engineering Journal**, v. 161, n. 1-2, p. 68-72, 2010.

JAGADEESAN, G. et al. Pyrazole Based Inhibitors against Enzymes of *Staphylococcus aureus*: A Computational Study. **Journal of Proteomics & Bioinformatics**, v. 8, n. 7, p. 142-148, 2015.

LEMONS, Anderson JG et al. Immunosensor assembled on polymeric nanostructures for clinical diagnosis of C-reactive protein. **Microchemical Journal**, v. 133, p. 572-576, 2017.

LEPECQ, J.-B.; PAOLETTI, C. A fluorescent complex between ethidium bromide and nucleic acids: physical—chemical characterization. **Journal of molecular biology**, v. 27, n. 1, p. 87-106, 1967.

LEVY, Micha; ZYLBER-KATZ, Ester; ROSENKRANZ, Bernd. Clinical pharmacokinetics of dipyron and its metabolites. **Clinical pharmacokinetics**, v. 28, n. 3, p. 216-234, 1995.

LUONG, John HT; MALE, Keith B.; GLENNON, Jeremy D. Boron-doped diamond electrode: synthesis, characterization, functionalization and analytical applications. **Analyst**, v. 134, n. 10, p. 1965-1979, 2009.

MALVAR, David do C. et al. Dipyron metabolite 4-MAA induces hypothermia and inhibits PGE2-dependent and-independent fever while 4-AA only blocks PGE2-dependent fever. **British journal of pharmacology**, v. 171, n. 15, p. 3666-3679, 2014.

MASEK, Anna; CHRZESCIJANSKA, Ewa; ZABORSKI, Marian. Estimation of the antioxidative properties of amino acids—An electrochemical approach. **Int. J. Electrochem. Sci**, v. 9, p. 7904, 2014.

NASIRIZADEH, Navid et al. Introduction of hematoxylin as an electroactive label for DNA biosensors and its employment in detection of target DNA sequence and single-base mismatch in human papilloma virus corresponding to oligonucleotide. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, n. 5, p. 2638-2644, 2011.

RAMOS, Fernanda Fonseca et al. Selection strategy of phage-displayed immunogens based on an in vitro evaluation of the Th1 response of PBMCs and their potential use as a vaccine against *Leishmania infantum* infection. **Parasites & vectors**, v. 10, n. 1, p. 617, 2017.

RODOVALHO, V. R. et al. Biosensors applied to diagnosis of infectious diseases—An update. **Austin Journal of Biosensors & Bioelectronics**, v. 1, n. 3, p. 1-12, 2015.

RODRIGUES, Luciano Pereira et al. Electropolymerization of hydroxyphenylacetic acid isomers and the development of a bioelectrode for the diagnosis of bacterial meningitis. **Journal of applied electrochemistry**, v. 45, n. 12, p. 1277-1287, 2015.

SALGADO, Claudio Guedes et al. mirnome expression analysis reveals new Players on leprosy immune Physiopathology. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 463, 2018.

SANTOS, Pedro MP et al. Scavenging activity of aminoantipyrines against hydroxyl radical. **European journal of medicinal chemistry**, v. 45, n. 6, p. 2258-2264, 2010.

TENG, Yue et al. Spectroscopic investigation on the toxicological interactions of 4-aminoantipyrine with bovine hemoglobin. **Journal of fluorescence**, v. 20, n. 1, p. 381-387, 2010.

TENG, Yue et al. The interaction between 4-aminoantipyrine and bovine serum albumin: multiple spectroscopic and molecular docking investigations. **Journal of hazardous materials**, v. 190, n. 1-3, p. 574-581, 2011.

WARING, M. J. Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids. **Journal of molecular biology**, v. 13, n. 1, p. 269-282, 1965.

ZHAO, Haiming et al. Electrochemical DNA detection using Hoechst dyes in microfluidic chips. **Current Applied Physics**, v. 12, n. 6, p. 1493-1496, 2012.

## REFERÊNCIAS

AZAM, Md Shofiul et al. Advancements and application of immunosensors in the analysis of food contaminants. **Nusant. Biosci**, v. 6, p. 186-195, 2014. <https://doi.org/10.13057/nusbiosci/n060212>

BENITES, Tiago A. et al. Efeitos da rugosidade superficial nas propriedades de passivação de monocamadas orgânicas automontadas. **Química Nova**, p. 1533-1537, 2014.

BUONFRATE, Dora et al. Severe strongyloidiasis: a systematic review of case reports. **BMC infectious diseases**, v. 13, n. 1, p. 78, 2013. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-78>

BUONFRATE, Dora et al. Novel approaches to the diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 21, n. 6, p. 543-552, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.04.001>

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Guia prático sobre a hanseníase [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – Brasília: **Ministério da Saúde**, 2017. 68 p.: il. Massara *et al.* (2016).

CARDOSO, R. et al. Peptide mimicking antigenic and immunogenic epitope of newwiedase from *Bothrops neuwiedi* snake venom. **Toxicon**, v. 53, n. 2, p. 254-261, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2008.11.009>

ČERVENKA, Petr et al. Kinetic mechanism for modeling of electrochemical reactions. **Physical Review E**, v. 85, n. 4, p. 041505, 2012. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.85.041505>

CHO, Il-Hoon et al. Current technologies of electrochemical immunosensors: Perspective on signal amplification. **Sensors**, v. 18, n. 1, p. 207, 2018. <https://doi.org/10.3390/s18010207>



COELHO, Eduardo Antonio Ferraz et al. Theranostic applications of phage display to control leishmaniasis: selection of biomarkers for serodiagnostics, vaccination, and immunotherapy. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 4, p. 370-379, 2015. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0096-2015>

CORTESE, Riccardo et al. Epitope discovery using peptide libraries displayed on phage. **Trends in biotechnology**, v. 12, n. 7, p. 262-267, 1994. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(94\)90137-6](https://doi.org/10.1016/0167-7799(94)90137-6)

DA SILVA, A. I.; ARAÚJO FILHO, H. C.; SILVA, Reinaldo Carvalho. Testes de desempenho de eletrodos: eletrodos de referência. **Quim. Nova**, v. 23, p. 512, 2000. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422000000400014>

DE ALMEIDA, Greyciele Rodrigues et al. PHAGE DISPLAY E SUA APLICAÇÃO EM MEDICINA VETERINARIA. **Enciclopédia Biosfera**, v. 11, n. 22, p. 2366–2382, 2015. [https://doi.org/10.18677/Enciclopedia\\_Biosfera\\_2015\\_208](https://doi.org/10.18677/Enciclopedia_Biosfera_2015_208)

DE BONA, Sheila; BASSO, Rita Maria Callegari. Hiperinfecção por *Strongyloides stercoralis* associada ao uso crônico de corticosteróide. **RBAC**, v. 40, n. 4, p. 247-250, 2008.

DE OLIVEIRA, DeJane PC et al. Biossensor eletroquímico baseado na enzima tirosinase para a determinação de fenol em efluentes. **Quim. Nova**, v. 38, n. 7, p. 924-931, 2015.

DO NASCIMENTO, Ronaldo Ferreira et al. Adsorção: aspectos teóricos e aplicações ambientais. **Biblioteca de Ciências e Tecnologia**, 2014.

Doenças negligenciadas / Wanderley de Souza, coordenador. – Rio de Janeiro: **Academia Brasileira de Ciências**, 2010. 56 p.:il. – (Ciência e tecnologia para o desenvolvimento nacional. Estudos estratégicos).

FARIA RAD, MESSADEC Y, HENEIDE LGD. Application of screen-printed carbon electrode as an electrochemical transducer in biosensors. **Int J Biosen Bioelectron**, 5(1), P. 1–2, 2019. <https://doi.org/10.15406/ijbsbe.2019.05.00143>

FELICIANO, Nagilla Daliane et al. Bacteriophage-fused peptides for serodiagnosis of human strongyloidiasis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 5, p. e2792, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002792>

GARCIA, Leila Posenato et al. Epidemiologia das doenças negligenciadas no Brasil e gastos federais com medicamentos. Texto para Discussão, **Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (IPEA)**, 2011.

GOWDA, Jayant I.; NANDIBEWOR, Sharanappa T. Binding and conformational changes of human serum albumin upon interaction with 4-aminoantipyrine studied by spectroscopic methods and cyclic voltammetry. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 124, p. 397-403, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2014.01.028>

HART, John P. et al. Some recent designs and developments of screen-printed carbon electrochemical sensors/biosensors for biomedical, environmental, and industrial analyses. **Analytical letters**, v. 37, n. 5, p. 789-830, 2004. <https://doi.org/10.1081/AL-120030682>

HAYAT, Akhtar; MARTY, Jean. Disposable screen-printed electrochemical sensors: Tools for environmental monitoring. **Sensors**, v. 14, n. 6, p. 10432-10453, 2014. <https://doi.org/10.3390/s140610432>

HOOGENBOOM, Hennie R. et al. Antibody phage display technology and its applications. **Immunotechnology**, v. 4, n. 1, p. 1-20, 1998. [https://doi.org/10.1016/S1380-2933\(98\)00007-4](https://doi.org/10.1016/S1380-2933(98)00007-4)

HOOGENBOOM, Hennie R.; CHAMES, Patrick. Natural and designer binding sites made by phage display technology. **Immunology today**, v. 21, n. 8, p. 371-378, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0167-5699\(00\)01667-4](https://doi.org/10.1016/S0167-5699(00)01667-4)

HU, Xinyue et al. UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> degradation of 4-aminoantipyrine: a voltammetric study. **Chemical Engineering Journal**, v. 161, n. 1-2, p. 68-72, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2010.04.025>

HUMBLOT, V. et al. Walking peptide on Au (110) surface: Origin and nature of interfacial process. **Surface Science**, v. 628, p. 21-29, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.susc.2014.05.004>

KEISER, Paul B.; NUTMAN, Thomas B. Strongyloides stercoralis in the immunocompromised population. **Clinical microbiology reviews**, v. 17, n. 1, p. 208-217, 2004. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.1.208-217.2004>

KYANI, Anahita; GOLIAEI, Bahram. Binding free energy calculation of peptides to carbon nanotubes using molecular dynamics with a linear interaction energy approach. Journal of Molecular Structure: **THEOCHEM**, v. 913, n. 1-3, p. 63-69, 2009. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.theochem.2009.07.018>

LADNER, Robert C. et al. Phage display-derived peptides as therapeutic alternatives to antibodies. **Drug discovery today**, v. 9, n. 12, p. 525-529, 2004. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(04\)03104-6](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(04)03104-6)

LASTÓRIA, Joel Carlos; ABREU, M. A. M. M. Hanseníase: diagnóstico e tratamento. **Diagn Tratamento**, v. 17, n. 4, p. 173-9, 2012.

LEAL, Cássia Rejane Brito. Métodos disponíveis e possíveis para o diagnóstico da leishmaniose visceral americana canina. **BEPA. Boletim Epidemiológico Paulista (Online)**, v. 6, n. 69, p. 14-18, 2009. ISSN 1806-4272.

Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana / Organização: Gerência Técnica de Doenças Transmitidas por Vetores e Antropozoonoses. - Coordenação de Vigilância Epidemiológica - Centro Nacional de Epidemiologia – **Fundação Nacional de Saúde** - Ministério da Saúde Brasília – 2000. 62 p. il.:

Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral / Departamento de Vigilância Epidemiológica - Secretaria de Vigilância em Saúde - **Ministério da Saúde Brasília** - 2014. 120 p.: il.

MARASINGHE, A. Cyclic Voltammetric Study of ferrocyanide/ferricyanide Redox Couple. **Minnesota State University Moorhead**, 2017.

MASSARA, Cristiano Lara et al. Caracterização de materiais educativos impressos sobre esquistossomose, utilizados para educação em saúde em

áreas endêmicas no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, p. 575-584, 2016. <https://doi.org/10.5123/S1679-49742016000300013>

MOINA, Carlos; YBARRA, Gabriel. Fundamentals and applications of immunosensors. In: **Advances in immunoassay technology**. IntechOpen, 2012. <https://doi.org/10.5772/36947>

MUTEEB, Ghazala et al. Phage Display Technique: A Novel Medicinal Approach to Overcome Antibiotic Resistance by Using Peptide-Based Inhibitors Against  $\beta$ -Lactamases. **Current drug metabolism**, v. 18, n. 2, p. 90-95, 2017. <https://doi.org/10.2174/1389200217666160727100434>

PACHECO, Wagner Felipe et al. Voltamétrias: Uma breve revisão sobre os conceitos. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 4, p. 516-537, 2013. DOI: 10.5935/1984-6835.20130040

PALAFX-HERNANDEZ, J. Pablo et al. Comparative study of materials-binding peptide interactions with gold and silver surfaces and nanostructures: a thermodynamic basis for biological selectivity of inorganic materials. **Chemistry of Materials**, v. 26, n. 17, p. 4960-4969, 2014. <https://doi.org/10.1021/cm501529u>

PANDE, Jyoti; SZEWCZYK, Magdalena M.; GROVER, Ashok K. Phage display: concept, innovations, applications and future. **Biotechnology advances**, v. 28, n. 6, p. 849-858, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.07.004>

PENNA, Matthew J. et al. Molecular-level understanding of the adsorption mechanism of a graphite-binding peptide at the water/graphite interface. **Soft Matter**, v. 11, n. 26, p. 5192-5203, 2015. <https://doi.org/10.1039/C5SM00123D>

PUTHIYAKUNNON, Santhosh et al. Strongyloidiasis—an insight into its global prevalence and management. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 8, p. e3018, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003018>

RAJESH, Chinagandham et al. A theoretical study on the interaction of aromatic amino acids with graphene and single walled carbon nanotube. **The Journal of chemical physics**, v. 130, n. 12, p. 124911, 2009. <https://doi.org/10.1063/1.3079096>

RAMI, Abbas et al. An overview on application of phage display technique in immunological studies. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 7, n. 7, p. 599-602, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2017.06.001>

REQUENA-MÉNDEZ, Ana et al. The laboratory diagnosis and follow up of strongyloidiasis: a systematic review. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7, n. 1, p. e2002, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002002>

RIBEIRO, Mara Dayanne Alves; SILVA, Jefferson Carlos Araujo; OLIVEIRA, Sabryna Brito. Estudo epidemiológico da hanseníase no Brasil: reflexão sobre as metas de eliminação. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 42, p. e42, 2018. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2018.42>

RICCI, Francesco; ADORNETTO, Gianluca; PALLESCHI, Giuseppe. A review of experimental aspects of electrochemical immunosensors. **Electrochimica Acta**, v. 84, p. 74-83, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2012.06.033>

SANTANA, L. K. L.; RICARDO, P. C.; SERUDO, R. L.; LASMAR, M. L. Imunossensores eletroquímicos e suas aplicações. **Scientia Amazonia**, v. 6, n. 1, p. 31-41, 2017. ISSN:2238.1910

SCHMITZ, U. et al. Phage display: a molecular tool for the generation of antibodies—a review. **Placenta**, v. 21, p. S106-S112, 2000. <https://doi.org/10.1053/plac.1999.0511>

SILVA, Tiago Pessoa Tabosa; FERREIRA, Israel de Lucena Martins. Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso. 2006. <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2006001100027>

SUDRÉ, Adriana Pittella et al. Diagnóstico da estrogiloidíase humana: importância e técnicas. **Revista de Patologia Tropical/Journal of Tropical Pathology**, v. 35, n. 3, p. 173-184, 2006. <https://doi.org/10.5216/rpt.v35i3.1876>

TÁVORA, Mariane Pinto Fernandes et al. Estudo de validação comparativo entre as técnicas Elisa e RIFI para diagnosticar Leishmania sp em cães errantes apreendidos no município de Campos dos Goytacazes, Estado do Rio de

Janeiro. **Rev Soc Bras Med Trop**, p. 482-483, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822007000400023>

VARATHARAJALU, R.; KAKUTURU, R. Strongyloides stercoralis: current perspectives. **Rep Parasitol**, v. 5, p. 23-33, 2016. <https://doi.org/10.2147/RIP.S75839>

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. **Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: first WHO report on neglected tropical diseases**. Geneva: World Health Organization, 2010.

WU, Chien-Hsun et al. Advancement and applications of peptide phage display technology in biomedical science. **Journal of biomedical science**, v. 23, n. 1, p. 8, 2016. <https://doi.org/10.1186/s12929-016-0223-x>

YAMANAKA, Keiichiro et al. Printable electrochemical biosensors: A focus on screen-printed electrodes and their application. **Sensors**, v. 16, n. 10, p. 1761, 2016. <https://doi.org/10.3390/s16101761>

YOU, Fei et al. Biopanning and characterization of peptides with Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles-binding capability via phage display random peptide library technique. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 141, p. 537-545, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.01.062>