

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA  
LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASSAMI

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA ELETROQUÍMICO DE DNA  
PARA DETECÇÃO RÁPIDA DE *Leishmania* sp.**

WESSULLA SUZANA BEZERRA RIBEIRO

RECIFE, 2013.

WESSULLA SUZANA BEZERRA RIBEIRO

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA ELETROQUÍMICO DE DNA  
PARA DETECÇÃO RÁPIDA DE *Leishmania* sp.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho

Co-orientadora: Dra. Maria da Paz Carvalho da Silva

RECIFE, 2013.

Catálogo na fonte  
Elaine Barroso  
CRB 1728

**Ribeiro, Wessulla Suzana Bezerra**

**Desenvolvimento de sistema eletroquímico de DNA para detecção rápida de *Leishmania* sp./ Wessulla Suzana Bezerra Ribeiro – Recife: O Autor, 2013.**

**44 folhas : il., fig., tab.**

**Orientadora: José Luiz de Lima Filho**

**Coorientadora: Maria da Paz Carvalho da Silva**

**Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Bioquímica e Fisiologia, 2013.**

**Inclui bibliografia**

- 1. *Leishmania* 2. Ácidos nucleicos 3. Eletroquímica I. Lima Filho, José Luiz de (orientador) II. Silva, Maria da Paz Carvalho da (coorientadora) III. Título**

**616.9363**

**CDD (22.ed.)**

**UFPE/CCB- 2013- 145**

WESSULLA SUZANA BEZERRA RIBEIRO

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA ELETROQUÍMICO DE DNA  
PARA DETECÇÃO RÁPIDA DE *Leishmania sp.***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, para obtenção do título de Mestre.

Aprovado por:

---

Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho  
Orientador

---

Membro interno: Profa. Dra. Maria da Paz Carvalho da Silva  
Co-orientadora – Titular Interno 1

---

Membro Externo: Profa. Dra. Rosângela Ferreira Frade de Araújo  
Titular Externo 1

---

Membro Externo: Dr. Gustavo Alves do Nascimento  
Titular Externo 2

1º Suplente: Profa. Dra. Maria do Carmo Pimentel

2º Suplente: Profa. Dra. Maria Tereza Corrêa

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

*A minha querida mãe, Elizete, minha fortaleza.  
Ao meu marido André, amado companheiro.*

## AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por estar presente em todos os momentos da minha vida, guiando-me.

Ao meu caríssimo orientador, **Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho**, pela oportunidade de fazer parte da sua equipe, por estar sempre disposto a escutar e compartilhar de sua sabedoria em ricas discussões. Agradeço pela confiança depositada e pela oportunidade que me fizeram crescer e desenvolver profissionalmente e como indivíduo.

À minha querida co-orientadora, **Profa. Dra. Maria da Paz Carvalho Silva**, meu “anjo da guarda”, pela confiança depositada, apoio incondicional, zelo e por compartilhar do seu riquíssimo saber. Agradeço por sua valiosa e indispensável orientação em minha formação pessoal e acadêmica. E pela oportunidade de ingressar no Mestrado.

Aos estimados professores **Dra. Maria do Carmo Pimentel, Dra. Rosângela Frade, Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Jr. e Dr. Luiz Carlos Peres**, meu respeito e profunda admiração pela competência profissional e humildade. Agradeço também pela contribuição valiosa nos momentos difíceis.

Ao caríssimo **Prof. Dr. Marcos Fidalgo**, meu orientador na Graduação, eterna gratidão pelo incentivo, consideração e ensinamentos.

À todos do **Grupo Biossensores – LIKA**: Pós-doutorando **Gustavo A. Nascimento**. Doutorandas: **Danielly S. Campos-Ferreira** e **Mariana S. Arruda**. As mestrandas **Deborah M.L. Zanforlin** e **Natália C. Oliveira**. Iniciação científica: **Maria A. S. M. Borba, Jeyselaine N.V. Lima** e **Mirella**

**M. Silva**, pelo apoio, incentivo, paciência, conhecimento compartilhado e momentos de muita alegria.

Aos amigos, **Roberta Godone, Mikaella Moura, José Manuel, Anderson Lima, Rafael Padilha, Luiz Paulo Nogueira e Amanda Dias** pela ajuda e momentos de alegria.

Ao **Laboratório de Imunopatologia Keiso Assami**, pelo uso de equipamentos e infraestrutura, essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao corpo de funcionários do Departamento de Bioquímica e da Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia da UFPE, em especial ao **Sr. José Miron Oliveira** (Assistente Administrativo) e **Sr. Djalma G. da Silva** (secretário).

A **UFPE, REUNI, CNPq e FACEPE**, pelo suporte financeiro.

*“A mente que se abre a uma nova idéia jamais volta ao seu tamanho original.”*

*(Albert Einstein)*

## RESUMO

A leishmaniose é um grupo de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, que afetam cerca de 12 milhões de pessoas em todo o mundo, sendo considerada como um problema de saúde pública mundial. Estratégias como diagnóstico e tratamento precoces podem interromper o ciclo de transmissão da doença. Biossensores eletroquímicos de DNA têm sido referidos como um método diagnóstico muito atrativo, devido à sua alta sensibilidade, seletividade, facilidade de utilização portabilidade e compatibilidade com técnica de análise eletroquímica. Este estudo teve como objetivo desenvolver um sistema eletroquímico utilizando eletrodo de grafite modificado com sequência de DNA de *Leishmania* sp. (sonda) para a detecção de *Leishmania* sp. A detecção foi feita por análise da oxidação eletroquímica do sinal de guanina na superfície do eletrodo por meio da técnica de voltametria de pulso diferencial. Inicialmente, foi realizado o pré-tratamento do eletrodo de trabalho, visando a otimização do processo de imobilização da sonda. Em seguida, a sonda foi imobilizada na superfície do eletrodo, onde se verificou que a concentração de 0.5  $\mu\text{M}$  era ideal para a imobilização. O processo de hibridação com a sequência alvo apresentou as seguintes características: faixa de linearidade de 0.035  $\mu\text{M}$  a 0.5  $\mu\text{M}$ , limite de detecção de 22.4 pM, limite de quantificação de 74.73 pM e desvio padrão relativo de 1.09 %. A seletividade foi analisada pelo processo de hibridação com diferentes sequências de ácidos nucleicos: alvo, não complementar e *mix* (alvo e não complementar), onde hibridação foi observada apenas com o alvo ou o *mix*. Portanto, através de estudos iniciais, o biossensor mostrou uma alta sensibilidade e seletividade para sequência alvo. No futuro, este biossensor pode ser capaz de contribuir para a detecção de *Leishmania* sp.

Palavras-chave: Biossensor eletroquímico, ácido nucleico, eletrodo de lápis de grafite, *Leishmania* sp.

## ABSTRACT

Leishmaniasis is a group of diseases caused by protozoa of the *Leishmania* genus which affect approximately 12 million of the worldwide people, and it is considered by the World Health Organization as a public health problem worldwide. In this sense, it is important that strategies are carried out to interrupt the cycle of the disease transmission. Among the strategies we can mention: the early diagnosis and treatment of infected patients, as well as vector control. Electrochemical biosensors for DNA have been reported as a diagnostic method very attractive due to its high sensitivity, selectivity, ease of use, portability and compatibility with electrochemical analysis technique. This study aimed to develop an electrochemical system using graphite electrode modified with DNA sequence of *Leishmania* sp. (probe) for detecting *Leishmania* sp. This detection was performed by analysis of guanine electrochemical oxidation on the electrode surface using the technique of differential pulse voltammetry. Initially, we performed pretreatment of the working electrode, aiming the optimization of the probe immobilization process. Then, the probe was immobilized on the electrode surface, which optimal concentration was found to be 0.5  $\mu\text{M}$ . The process of hybridization with the target sequence had the following characteristics: linearity range of 0.035 to 0.5  $\mu\text{M}$ , detection limit of 4.22 pM, quantification limit of 74.73 pM and a standard deviation of 1.09%. The selectivity was analyzed by hybridization procedure with different nucleic acid sequences: target, non-complementary and mix (target and non-complementary) where hybridization was observed only with the target or the mix. Therefore, through initial studies, the biosensor showed high sensitivity and selectivity for the sequence target. In the future, this biosensor may be able to contribute for *Leishmania* sp. detection.

Keyword: Electrochemical biosensor, nucleic acid, pencil graphite electrode, *Leishmania* sp.

## LISTA DE FIGURA

- Figura 1** – Fêmea de flebotomíneo ingurgitada (Foto ampliada). 4
- Figura 2** - Documentação das formas clínicas da leishmaniose humana: leishmaniose cutânea (A), leishmaniose cutânea difusa (B), leishmaniose visceral (C) - nota-se a hepatoesplenomegalia como delineado e leishmaniose mucocutânea (D) - nota-se a destruição do septo nasal e lábios. 4
- Figura 3** - Ciclo de vida do parasita *Leishmania spp.* 5
- Figura 4** - Formas evolutivas da *Leishmania*. (A) Forma promastigota ou (B) amastigota. 6
- Figura 5** - Taxonomia da *Leishmania*. 6
- Figura 6** - Casos de leishmaniose visceral – Brasil, 1980-2009. 8

## ARTIGO

- Figure 1** - Current peaks of the guanine oxidation signal with different concentrations of DNA probe in pencil graphite electrode activated (0.125  $\mu\text{M}$ , 0.25  $\mu\text{M}$ , 0.5  $\mu\text{M}$ , 0.75 $\mu\text{M}$ , 1.0 $\mu\text{M}$  and 2  $\mu\text{M}$ ). The results were plotted using the means of experiments performed in triplicate. 40
- Figure 2** In (A) Histogram of guanine oxidation and (B) differential pulse voltammograms at (a) DNA probe (0.5  $\mu\text{M}$ ) immobilized on activated PGE before hybridization, (b) DNA probe (0.5  $\mu\text{M}$ ) after hybridization with a complementary sequence (target) (0.5  $\mu\text{M}$ ), (c) with non-complementary sequence (0.5  $\mu\text{M}$ ), and (d) with mixture of complementary target an non-complementary (1.0  $\mu\text{M}$  each). Voltammetric conditions: Scanning potential 41

steps, 20 mV/s. Potential amplitude, 50 mV.

**Figure 3** - Plot of difference of guanine oxidation signal of the probe-modified PGE in the absence and presence of the target vs. target concentration. Calibration graph at concentration range 0.035 – 0.5  $\mu\text{M}$  for complementary target. **42**

**Table 1.** Comparison of proposed biosensor characteristics obtained in this work with other electrochemical biosensors. **43**

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Ag/AgCl	Prata/Cloreto de prata
AFM	<i>Atomic Force Microscopy</i>
DAT	Teste de aglutinação direta
DPV	<i>Differential pulse voltammetric</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbet Assay</i>
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>
IDRM	Intradermoreação de Montenegro
IgG	Imunoglobulina G
IUPAC	<i>Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
LV	Leishmaniose visceral
NaCl	Cloreto de sódio
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PGE	<i>Pencil grafite electrode</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
QCM	<i>Quartz crystal microbalance</i>
RIFI	Reação de imunofluorescência indireta
rK39	Antígeno recombinante rK39
WHO	<i>World Health Organization</i>

## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>vii</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>ix</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....</b>	<b>x</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
<b>2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>03</b>
2.1 Aspectos Gerais das Leishmanioses.....	03
2.2 Aspectos Epidemiológicos.....	07
2.3 Leishmaniose visceral.....	08
2.3.1 Métodos Diagnósticos.....	09
2.4 Leishmaniose tegumentar americana.....	11
2.4.1 Métodos Diagnósticos.....	12
2.5 Biossensores.....	14
2.5.1 Conceitos e definições.....	14
2.5.2 Classificação dos biossensores.....	15
2.5.2.1 Quanto ao elemento de reconhecimento biológico.....	15
2.5.2.2 Quanto ao tipo de transdutor.....	16
2.6 Biossensores eletroquímicos de ácidos nucleicos.....	18
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>19</b>
<b>3.1 Geral.....</b>	<b>19</b>
<b>3.2 Específicos.....</b>	<b>19</b>
<b>4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>20</b>
<b>5. CAPÍTULO 1. Developing DNA electrochemical system for <i>Leishmania</i> sp. detection .....</b>	<b>25</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>44</b>

## I. INTRODUÇÃO

As leishmanioses constituem um grupo de doenças causadas por um protozoário flagelado da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, do gênero *Leishmania* que afeta cerca de 88 países de clima preferencialmente tropical ou subtropical. Estima-se que as leishmanioses acometam anualmente 12 milhões de pessoas em todo o mundo (NAKKASH-CHMAISSE et al., 2011; TOLETO et al., 2010; SILVA-LOPES, 2010; BERNARDO, 2009) e que 350 milhões de indivíduos estejam em risco de contaminação (COSTA, 2011). Acredita-se que o número de infectados é subestimado pela deficiência de diagnóstico, grupo de indivíduos assintomáticos e pela falta de notificação adequada (BERNARDO, 2009). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), as leishmanioses são consideradas um problema de saúde pública, principalmente por sua alta incidência em países em desenvolvimento (PERINOTO et al., 2010).

A infecção ocorre quando os insetos fêmea do gênero *Phlebotomus* ou *Lutzomyia* picam o homem e outros mamíferos, ingerindo as formas amastigotas da *Leishmania* presente na derme do hospedeiro infectado. Em seguida, as amastigotas evoluíram no trato digestivo anterior do inseto para as formas promastigotas. Conseqüentemente, quando o flebotomíneo infectado faz o repasto sanguíneo sobre o hospedeiro não infectado, o vetor inocula as formas promastigotas infectantes presentes no seu trato digestivo, onde se diferenciarão em amastigotas nos tecidos dos vertebrados, continuando assim o ciclo (MISSAWA et al., 2008). Dependendo do tipo de parasita causador da infecção, as leishmanioses podem apresentar duas principais formas clínicas: a leishmaniose visceral (LV) ou a leishmaniose tegumentar americana (LTA) (MOTA & MIRANDA, 2011; PERINOTO et al., 2010).

A leishmaniose tegumentar americana caracteriza-se pela presença de lesões na pele e mucosas. São frequentemente diagnosticadas pela investigação clínica associada ao diagnóstico laboratorial, ou através de microscopia em exame de esfregaços e biópsias de lesões de pele (BRASIL, 2009).

A leishmaniose visceral, forma mais grave da doença, tem como característica o acometimento de órgãos como fígado e baço, podendo levar à morte do indivíduo, caso não seja tratada (MOTA & MIRANDA, 2011; MOHAN et al., 2011). É habitualmente diagnosticada através da detecção de IgG, um anticorpo que se liga especificamente aos antígenos de *Leishmania*. O método *Enzyme-linked immunosorbent Assay* (ELISA) é amplamente utilizado para diagnóstico da leishmaniose visceral (LAKHAL et al., 2012).

De forma geral, essas afecções são difíceis de serem controladas, haja vista a demanda de aspectos envolvidos, tais como: a diversidade biológica do parasita; a existência de várias espécies de mamíferos e vetores que podem atuar como hospedeiros; fatores socioeconômicos e diferentes formas clínicas da doença; medicamentos de alto custo e elevada toxicidade, bem com a ausência de uma vacina totalmente eficaz. Apesar disto, é possível controlar a transmissão da leishmaniose, através de estratégias que incluam o diagnóstico e tratamento precoce dos pacientes (SILVA-LÓPES, 2010).

Além disso, os métodos de diagnóstico usuais ainda possuem muitas limitações, seja por sua baixa especificidade e seletividade ou limitações relacionadas ao custo e aplicabilidade em campo (PERINOTO et al., 2010). Portanto, o desenvolvimento de métodos alternativos para o diagnóstico rápido e eficaz da leishmaniose é altamente necessário, uma vez que a detecção precoce da doença está diretamente relacionada a eficiência do tratamento.

Recentemente, um número expressivo de pesquisas fundamentadas na detecção eletroquímica da hibridização do DNA tem sido surgidas (LI et al., 2011). Os biossensores eletroquímicos de DNA são comumente usados para detecção de eventos de hibridização (SOUZA et al., 2011), baseados na imobilização de sequências nucleotídicas em transdutores eletroquímicos. Estes sistemas possuem uma metodologia simples, precisa e de baixo custo para o diagnóstico de doenças (PERINOTO et al., 2010).

No nosso estudo, um sistema eletroquímico de DNA foi produzido com base na imobilização de sequência de oligonucleotídeos complementar relacionada à *Leishmania* sp. sobre eletrodo de lápis de grafite para detecção rápido deste parasita.

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 Aspectos Gerais das Leishmanioses

As leishmanioses são doenças parasitárias crônicas, causadas por diferentes espécies de protozoários flagelados da ordem *Kinetoplastidae*, família *Trypanosomatidae*, do gênero *Leishmania* (BERNARDO, 2009) que infectam cães, raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyonthus*), marsupiais (*Didelphis albiventris*) e seres humanos. A transmissão ocorre através da picada do inseto fêmea da ordem Diptera, da subfamília *Phlebotominae* (**Figura 1**), que ao exercer o repasto sanguíneo sobre um hospedeiro não infectado, inocula as formas promastigotas infectantes presentes no seu trato digestivo anterior, que se diferenciaram em amastigotas nos tecidos dos vertebrados. (MISSAWA et al., 2008). No Brasil, duas espécies de vetores estão relacionadas com a transmissão da doença – a *Lutzomyia longipalpis* e a *Lutzomyia cruzi* – ambos são infectados pelo protozoário *Leishmania (L.) chagasi*. A *Lutzomyia longipalpis* é considerada a principal espécie transmissora da *Leishmania (Leishmania) chagasi*. Popularmente, estes vetores também são conhecidos como mosquito palha, tatuquiras, birigui, entre outros nomes (BRASIL, 2009). No cenário global, a distribuição das espécies transmissoras das *Leishmanias* obedece a certas características do espaço geográfico que habitam, sendo o gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo, e *Lutzomyia* no Novo Mundo (COSTA, 2011; BERNARDO, 2009).

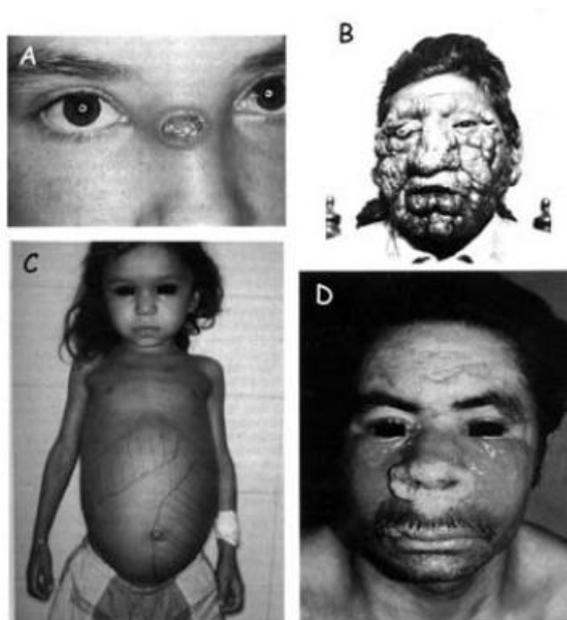
As várias formas clínicas da leishmaniose são causadas por cerca de vinte espécies do protozoário do gênero *Leishmania* (SOUZA, 2007), sendo as principais formas: a leishmaniose tegumentar (LT) ou leishmaniose tegumentar americana (LTA); e a leishmaniose visceral ou calazar (LV) (**Figura 2**). A leishmaniose tegumentar americana ocorre quando há o surgimento de lesões cutâneas ou mucocutânea, enquanto que a leishmaniose visceral acometem principalmente os órgãos os que fazem parte do sistema fagocítico-mononuclear proeminente (fígado, baço e medula óssea), podendo levar o indivíduo a óbito, caso não seja tratada (MOTA & MIRANDA, 2011; MOHAN et al, 2011).

**Figura 1.** Fêmea de flebotomíneo ingurgitada (Foto ampliada).



**Fonte:** BRASIL (2010).

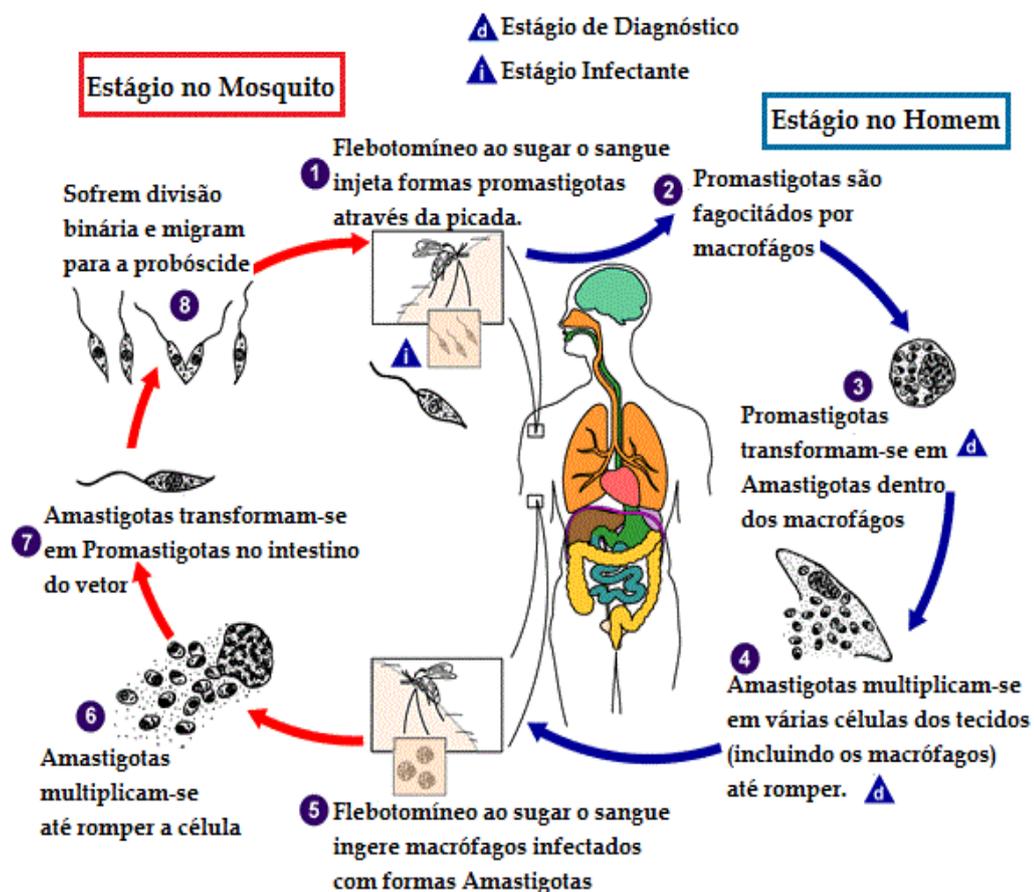
**Figura 2.** Documentação das formas clínicas da leishmaniose humana: (A) leishmaniose cutânea, (B) leishmaniose cutânea difusa, (C) leishmaniose visceral - nota-se a hepatoesplenomegalia como delineado - e (D) leishmaniose mucocutânea - nota-se a destruição do septo nasal e lábios.



**Fonte:** SILVA-LÓPES (2010).

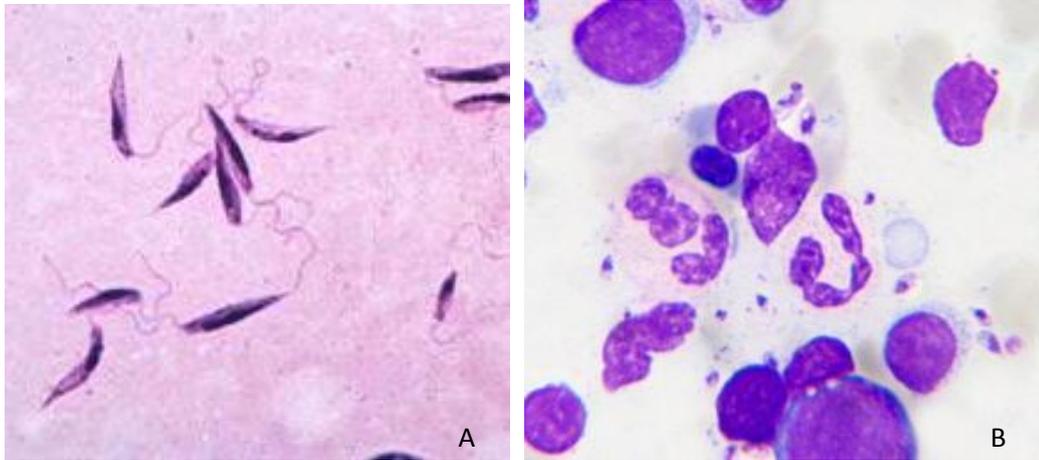
Quanto ao protozoário, são conhecidas duas formas evolutivas distintas durante seu ciclo de vida (**Figura 3**): a forma promastigota e a amastigota (**Figura 4**) (COSTA, 2011). A forma amastigota se caracteriza pelo aspecto de organismos com estruturas arredondadas ou ovaladas, sem flagelo livre, medindo cerca de 4 a 6  $\mu\text{m}$ , comportando-se como parasito intracelular obrigatório de macrófagos dos hospedeiros vertebrados. A forma promastigota é alongada, medindo 12 a 20  $\mu\text{m}$  e apresenta um flagelo livre e longo que emergi do corpo do parasita na sua porção anterior. Esta forma é encontrada no trato digestivo do hospedeiro invertebrado, o flebotomíneo (BERNARDO, 2009).

**Figura 3.** Ciclo de vida do parasita *Leishmania spp.*



**Fonte:** Centers for Disease Control & Prevention (2006).

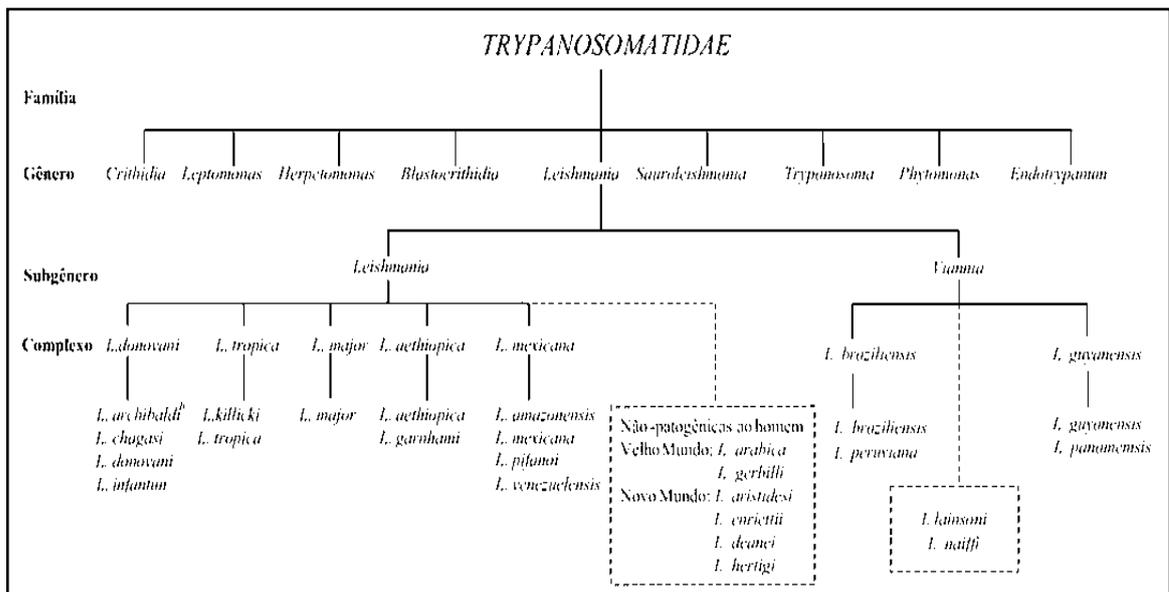
**Figura 4.** Formas evolutivas da *Leishmania*. (A) Forma promastigota ou (B) amastigota.



Fonte: Fiocruz (2013).

Na **Figura 5** é descrita a classificação do gênero *Leishmania*, com subgêneros e respectivos complexos (BRASIL, 2007):

**Figura 5.** Taxonomia da *Leishmania*.



## 2.2 Aspectos Epidemiológicos

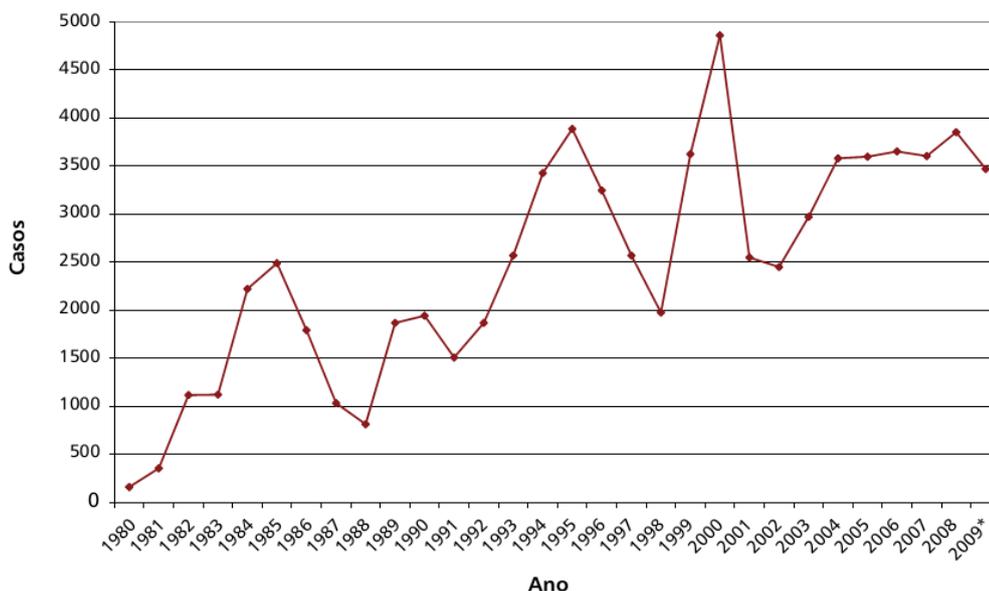
Atualmente, as leishmanioses estão distribuídas em quatro continentes: África, Ásia, Europa e América. Dentre os países mais afetados com a leishmaniose visceral, destacam-se: Bangladesh, Brasil, Índia, Etiópia, Quênia e Sudão. O Brasil representa 90% da incidência dos casos ocorridos na América Latina (COSTA, 2011; BRASIL, 2010; QUINNELL & COURTENAY, 2009; MISSAWA et al., 2008). As leishmanioses apresentam uma alta incidência anual de 2 milhões de casos das diferentes formas clínicas (1.5 milhões de casos relacionados a LTA e 0.5 milhões para LV) (COSTA, 2011; BERNARDO, 2009). Ainda, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), as leishmanioses estão entre as cinco doenças infecto-parasitárias com maior relevância endêmica no mundo (MOTA & MIRANDA, 2011).

No Brasil, no período de 1988 a 2009, a LTA apresentou média anual de 27.093 casos registrados e coeficiente médio de detecção de 16 casos a cada 100 mil habitantes. Picos de transmissão da leishmaniose tegumentar são observados a cada cinco anos, apresentando tendência de aumento do número de casos a partir de 1985, quando se solidifica a implantação das ações de vigilância e controle da doença no País. A leishmaniose visceral apresenta comportamento epidemiológico cíclico, com elevação de casos em períodos médios a cada cinco anos (GOES et al., 2012). No período de 1998 a 2009, a média anual de casos foi de 3,34 e a incidência de 1,97 casos a cada 100 mil habitantes. Observa-se que a letalidade vem aumentando gradativamente, passando de 3,2 % em 2000 para 5,7 % em 2009 (BRASIL, 2011).

A leishmaniose visceral vem se expandindo de forma gradativa para as regiões Norte, Sudeste e Centro-Oeste, onde passaram de 17 % (829/4.858) do total de casos em 2000, para 48 % (1.863/3.852) em 2008 (**Figura 6**) (BRASIL, 2010).

Em 2009, o Estado de Pernambuco notificou 501 casos de leishmaniose tegumentar americana, com coeficiente de detecção de 5,7 casos por 100.000 habitantes, estando os municípios de Vitória de Santo Antão, Vicência e Igarassu correspondendo a 38,5 % do total de casos registrados no Estado. Em relação à leishmaniose visceral, foram confirmados 62 casos, com um coeficiente de incidência de 0,7 casos por 100.000 habitantes. A letalidade registrada foi de 8,1 %. Do total de casos confirmados no Estado, 33,3 % eram dos municípios de Salgueiro, Dormentes, Ouricuri, Petrolina e Santa Maria da Boa Vista (BRASIL, 2009).

**Figura 6.** Casos de leishmaniose visceral – Brasil, 1980-2009.



**Fonte:** BRASIL (2009).

### 2.3 A Leishmaniose Visceral

A leishmaniose visceral é uma doença crônica, caracterizada por febre de longa duração, perda de peso, astenia, adinamia e anemia, dentre outras manifestações. Quando não tratada, pode evoluir para óbito do paciente em mais de 90 % dos casos. Pode ainda ser chamada de Calazar, esplenomegalia tropical, dentre outras denominações. Nas Américas, o agente mais comumente envolvido na transmissão da LV é o protozoário do gênero *Leishmania (Leishmania) chagasi* (BRASIL, 2011).

Dentro do tubo digestivo do vetor, as formas amastigotas se diferenciam em promastigotas (flageladas). E nas Américas, a *Leishmania (Leishmania) chagasi* é a espécie comumente envolvida na transmissão (BRASIL, 2011). Contudo, vale ressaltar que outras espécies podem está envolvidas neste ciclo e que a alteração no ambiente natural e presença da *L. infatum* podem aumentar a incidência desta doença no Brasil (COSTA, 2011).

### 2.3.1 Métodos Diagnósticos

Clinicamente, a LV pode ser confundida com outras doenças, tais como: a enterobacteriose de curso prolongado (associação de esquistossomose com salmonela ou outra enterobactéria), malária, brucelose, febre tifoide, esquistossomose hepatoesplêndica, doença de chagas (forma aguda), linfoma, mieloma múltiplo, anemia falciforme, entre outras (BRASIL, 2009). Desta forma, os diagnósticos laboratoriais são aconselháveis para confirmação da doença, sendo estes divididos em: métodos parasitológicos, sorológicos e moleculares (NOGUEIRA et al., 2009).

Os diagnósticos imunológicos são baseados na pesquisa de anticorpos contra *Leishmania*, dentre eles, estão (BRASIL, 2009; ASSIS et al., 2008):

a) Imunofluorescência indireta (RIFI): é realizada com antígenos fixados em uma lâmina, onde inicialmente se aplica um anticorpo específico não fluorescente. Em seguida, coloca-se um anticorpo fluorescente com especificidade marcada contra determinantes antigênicos do primeiro anticorpo utilizado para reagir com o antígeno. Esta técnica apresenta como vantagem a possibilidade de se ter uma fluorescência mais evidente, pelo fato do anticorpo fluorescente se ligar apenas aos anticorpos primários. Esta técnica tem sido amplamente usada no diagnóstico da LV desde 1964 e atualmente é disponibilizada pelo Sistema Único de Saúde (SUS), com a desvantagem de requerer microscópio de imunofluorescência. São relatadas para esse teste, sensibilidade de 82 a 95 % e especificidade de 78 a 92 %;

b) Ensaio imunoenzimático (ELISA): o resultado é expresso em unidades de absorvância a um raio de luz em uma reação com diluições fixas ou, mais comumente, apenas como reagente ou não. Embora os valores de sensibilidade apresentem reprodutibilidade, variando entre 90 e 100 %, os valores de especificidade são bastante inconsistentes, variando de 71 a 100 %. A baixa especificidade é a desvantagem comum aos métodos que usam antígenos não purificados, causada pela reatividade cruzada e persistência de anticorpos após a cura. Essa especificidade aumenta quando são utilizados alguns antígenos purificados sintéticos, entre eles, a proteína recombinante K39 (rK39), que combinada ao método ELISA, resulta em sensibilidade de 93 a 99 % e especificidade de 93 a 100 %;

c) PCR (Polymerase Chain Reaction): Este diagnóstico molecular possibilita a detecção do DNA do parasito mediante reação de polimerização em cadeia, usando-se diversas amostras biológicas, tais como sangue e aspirado de medula. Com elevada sensibilidade (acima de 90 %) e especificidade (100 %). Ainda assim, sua realização é complexa e apresenta custo elevado.

Os exames parasitológicos são considerados métodos de referência no diagnóstico da leishmaniose visceral, embora necessitem de procedimentos invasivos, laboratoristas experientes, e não apresentem sensibilidade adequada (ASSIS et al., 2008). Esse diagnóstico é baseado na procura de formas amastigotas do parasito em material biológico, preferencialmente da medula óssea (por ser um procedimento mais seguro), linfonodo ou baço, necessitando em alguns casos, de ambiente hospitalar e condições cirúrgicas. A punção aspirativa esplênica é o método que oferece maior sensibilidade (de 90 % a 95 %) para demonstração do parasito, seguida pelo aspirado de medula óssea, biópsia hepática e aspiração de linfonodos. Esse tipo de diagnóstico pode ser realizado pelos seguintes métodos (BRASIL, 2009):

a) Exame direto – formas amastigotas do parasito podem ser visualizadas pelas colorações de Giemsa ou Wright, Leishman, Panóptico. O encontro de parasitos no material examinado depende do número de campos observados (200 campos devem ser examinados antes de se considerar uma lâmina como negativa). Dentre as limitações do método, está a probabilidade de diagnóstico falso-negativo em infecções recentes;

b) Isolamento em meio de cultura (*in vitro*) – formas amastigotas do parasito, inoculadas em meios de cultura especiais contendo ágar, NaCl, água destilada e sangue de coelho, transformam-se em formas promastigotas. As culturas devem ser mantidas entre 24°C e 26°C e observadas em microscopia óptica comum ou invertida, semanalmente, até 4 semanas. O controle da temperatura e demora do diagnóstico, são algumas das limitações desse método;

c) Isolamento em animais suscetíveis (*in vivo*) – a inoculação experimental, em *hamsters* (*Mesocricetus spp*), de amostras de tecidos de pacientes com suspeita de LV não tem valor prático no diagnóstico da doença, devido ao seu tempo de positividade (de 1 a 3

meses). O uso de animais e a pouca sensibilidade estão entre as desvantagens da utilização desse método.

## 2.4 Leishmaniose Tegumentar Americana

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença infecciosa, crônica, não contagiosa, transmitida por vetores do gênero *Lutzomyia*. No Brasil, as principais espécies envolvidas na transmissão da LTA são: *L. whitmani*, *L. intermedia*, *L. umbratilis*, *L. wellcomei*, *L. flaviscutellata*, e *L. migonei*. As principais manifestações clínicas desta enfermidade são: lesões cutâneas (formas localizada, disseminada ou difusa), lesões mucosas (cavidades nasais, seguida de faringe, laringe e cavidade oral). As formas cutâneas provocam lesões na pele que, dependendo das picadas infectantes do vetor, podem ser únicas ou múltiplas (BRASIL, 2009). As lesões produzidas são de vários tipos, podendo cicatrizar espontaneamente em alguns meses. Na forma mucosa, as lesões da mucosa nasal são as mais frequentes e iniciam-se por ulcerações do septo nasal, que podem evoluir para perfuração, com grande potencial destrutivo e mutilante, sendo difícil o tratamento e rara a cura espontânea (MOTA & MIRANDA, 2011). O período de incubação da doença no ser humano é, em média, de dois a três meses, podendo variar de duas semanas a dois anos (BRASIL, 2007).

Nas Américas, são atualmente reconhecidas 11 espécies dermatrópicas de *Leishmania* responsáveis pela doença humana e 8 espécies descritas para animais. No Brasil, são identificadas 7 espécies, sendo 6 do subgênero *Viannia* e 1 do subgênero *Leishmania* (MOTA & MIRANDA, 2011; BRASIL, 2009):

a) *Leishmania (Leishmania) amazonenses*: distribuída pelas florestas primárias e secundárias da Amazônia (Amazonas, Pará, Rondônia, Tocantins e sudoeste do Maranhão), Nordeste (Bahia), Sudeste (Minas Gerais e São Paulo) e Centro-oeste (Goiás);

b) *Leishmania (Viannia) guyanensi*— aparentemente limitada ao norte da Bacia Amazônica (Amapá, Roraima, Amazonas e Pará) e estendendo-se pelas Guianas. É encontrada principalmente em florestas de terra firme e em áreas que não se alagam no período de chuvas;

c) *Leishmania (Viannia) braziliensis*: tem ampla distribuição, do sul do Pará ao Nordeste, atingindo também o centro-sul do país e algumas áreas da Amazônia Oriental. Na Amazônia, a infecção é usualmente encontrada em áreas de terra firme. Quanto ao subgênero *Viannia* existem outras espécies de *Leishmania* recentemente descritas: *L. (V) lainsoni*, *L. (V) naiffi*, com poucos casos humanos no Pará; *L. (V) shawi*, com casos humanos encontrados no Pará e Maranhão. Mais recentemente, as espécies *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberge* *L. (V.) shawi* foram identificadas em estados das regiões Norte e Nordeste do Brasil.

#### 2.4.1 Métodos Diagnósticos

O diagnóstico de um processo infeccioso por leishmaniose tegumentar é feito pela visualização do parasito, ou de seus produtos, nos tecidos ou fluidos biológicos dos hospedeiros. Portanto, recomenda-se a confirmação do diagnóstico por método parasitológico, antes do início do tratamento, especialmente naqueles casos com evolução clínica fora do habitual e/ou má resposta a tratamento anterior. A utilização de métodos de diagnóstico laboratorial visa não apenas à confirmação dos achados clínicos, mas pode fornecer importantes informações epidemiológicas através da identificação da espécie circulante, orientando no sentido de quais medidas devem ser adotadas para o controle do agravo (BRASIL, 2009). Ainda de acordo com o estudo citado, o diagnóstico laboratorial da leishmaniose tegumentar é constituído de três grupos principais de exames: o parasitológico, o imunológico e os testes moleculares (BRASIL, 2010):

a) Exames Parasitológicos: baseado na demonstração do parasito por meio de exame direto. É realizado a partir da demonstração direta do parasito, devido à rapidez, baixo custo e fácil execução - sendo o mais utilizado. Entretanto, a probabilidade do encontro do parasito na amostra é inversamente proporcional ao tempo de evolução da lesão cutânea, sendo rara após 1 ano. Conseqüentemente, há uma grande probabilidade de testes falso-negativos em testes tardios;

b) Exames Imunológicos: O teste de primeira escolha é o teste de intradermorreação de Montenegro (IDRM), que se fundamenta na visualização da resposta de hipersensibilidade

celular retardada. A IDRM geralmente persiste positiva após o tratamento e cicatrização da lesão cutânea tratada ou curada espontaneamente, podendo negativar nos indivíduos fracoreatores e nos precocemente tratados. Em áreas endêmicas, a IDRM positiva pode ser interpretada como leishmaniose anterior ou mesmo aplicação anterior de antígeno de IDRM, exposição ao parasito sem doença (infecção), alergia ao diluente do teste ou reação cruzada com outras doenças (doença de Chagas, esporotricose, hanseníase virchowiana, tuberculose, cromomicose, entre outras). Nas populações endêmicas, a positividade pode variar entre 20 e 30 % quando há ausência de lesão ativa ou cicatriz, e ser negativa nas 4 a 6 primeiras semanas após o surgimento da lesão cutânea. Outros testes sorológicos detectam anticorpos anti-*Leishmania* circulantes no soro dos pacientes com sensibilidade geralmente baixa (MOTA & MIRANDA, 2011). Nas lesões ulceradas por *L. (Vianna.) braziliensis*, a sensibilidade ao teste de Imunofluorescência Indireta (IFI) é relativamente baixa, em torno de 70 %, no primeiro ano da doença; enquanto que, nas lesões por *L. (Vianna.) guyanensis*, a sensibilidade ainda menor. Outra desvantagem do método é devido a alguns pacientes serem persistentemente negativos. Relatos de reação falso-negativa em pacientes com LT e de reações falso-positivas em pacientes com outras doenças (LV, doença de Chagas, pênfigo foliáceo sul-americano, paracoccidiodomicose, esporotricose, entre outras), levam a questionamentos sobre o potencial valor da técnica em reconhecer casos de LT em que não houve demonstração do parasito. Portanto, a sorologia não é indicada como critério isolado de cura ou de previsão de recorrência. Nesses casos, a presença ou ausência de lesões tegumentares em atividade é o critério decisivo.

c) Teste Moleculares: A PCR (reação em cadeia de polimerase) é um método que vem sendo amplamente utilizado para fins de pesquisa. Mas em rotina de diagnóstico, é pouco usado, apesar de acrescentar uma maior sensibilidade quando utilizado com os métodos parasitológicos tradicionais.

Diante do exposto, observa-se que as metodologias diagnósticas da leishmaniose disponíveis na rede de saúde pública e privada ainda são limitadas, seja por fatores como baixa sensibilidade e seletividade, ou diagnóstico demorado. O padrão-ouro para a detecção de leishmaniose envolve o isolamento de parasitas, seja microscopicamente ou por cultura. Em ambos os métodos, as amostras são obtidas de modo invasivo. Além disso, métodos mais eficazes com a PCR possuem alto custo, bem como a necessidade de profissionais e

laboratórios altamente especializados. Portanto, a busca por alternativas para o diagnóstico eficiente e rápido da leishmaniose é altamente necessária.

## **2.5 Biossensores**

### **2.5.1 Conceitos e Definições**

O biossensor é definido como uma ferramenta ou dispositivo analítico que combina elementos biológicos imobilizados em transdutores físico-químicos, criando assim uma superfície que permite a medição direta de um analito específico, que é proporcional à concentração do analito (MELO, 2008).

Dentre os elementos de reconhecimento biológicos utilizados na construção de biossensores, destacam-se: sequências de DNA ou RNA, enzimas, antígeno, anticorpo, organelas, peptídeos, organismos, células (SOUZA, 2011), aptâmeros (SONG et al., 2012; HANG et al., 2010; STREHLITZ et al., 2008).

O sistema transdutor tem como função a tradução da informação a partir de uma informação bioquímica, geralmente um concentração do analito, em um sinal de saída, químico ou físico, com uma sensibilidade definida. Sendo assim, seu principal objetivo é fornecer um elevado grau de seletividade para um determinado analito (LABUDA, et al., 2010).

Muitos grupos de pesquisas têm buscado novas estratégias visando o tratamento e diagnóstico de doenças de forma eficaz e com custo reduzido (PERINOTO et al., 2010). A utilização de biossensores de DNA tem sido reportada como método alternativo para diagnósticos de inúmeras infecções, como: Papilomavirus bovino (NASCIMENTO et al., 2012), vírus da imunodeficiência humana (TRAN et al., 2011), dengue (SOUZA et al., 2011), entre outras. Em contraste com algumas técnicas existentes para detecção de DNA, como fluorescência, espectroscopia de ressonância de plasma de superfície e microbalança de cristal de quartzo, as técnicas eletroquímicas (LIU et al., 2010) possuem são várias vantagens: simplicidade, rapidez, baixo-custo e alta sensibilidade (LI et al., 2011; LIU et al., 2010), além de simplificar o protocolo para detecção de ácidos nucleicos (SOUZA et al., 2011; HEJAZI, et al., 2008; KARAMOLLAOGLU et al., 2009; SOUZA et al., 2009).

Os eletrodos modificados com ácido nucleico (polinucleotídeos) identificam sua sequência complementar pelo princípio de complementaridade, formando uma dupla hélice de DNA. Ou seja, quando a sequência de oligonucleotídeos alvo corresponde a sonda (com base no princípio de complementaridade das bases, afirmando-se que os pares G com C e A com T ou U são complementares) um híbrido é formado (sonda-alvo), mesmo na presença de uma mistura contendo ácidos nucleicos complementares e não complementares (SOUZA et al., 2011).

## **2.5.2 Classificações dos biossensores**

Os biossensores podem ser classificados de acordo com o elemento biológico de reconhecimento ou transdutor.

### **2.5.2.1 Quanto ao elemento de reconhecimento biológico:**

Em relação ao elemento biológico, os biossensores podem ser classificados em (RUDOLF, 2005):

a) Biossensores enzimáticos: são baseados na catálise de um substrato. Utilizam enzimas como elementos de biorechecimento. Este dispositivo combina a sensibilidade e a seletividade de uma enzima em um transdutor;

b) Imunossensores: são biossensores que monitoram as interações do par anticorpo-antígeno, nas quais o anticorpo ou o antígeno são imobilizados na superfície transdutora. A sensibilidade de um imunossensor depende da afinidade e da especificidade da ligação;

c) Biossensores celulares: estes biossensores utilizam micro-organismos, especialmente, para o monitoramento ambiental de poluentes. As células são incorporadas à superfície de um eletrodo, sendo o princípio de operação muito semelhante aos biossensores enzimáticos, contudo apresentam custo reduzido, maior atividade catalítica e estabilidade;

d) Genossensores: são dispositivos que utilizam uma sonda de ácido nucléico (DNA ou RNA) imobilizada como elemento de reconhecimento (LABUDA, 2010);

e) Aptasensores: São biossensores que utilizam aptâmeros como elemento de bioreconhecimento. Os aptâmeros podem ser sequências de DNA ou RNA (30 a 100 nucleotídeos) que reconhecem ligantes específicos por um processo de seleção *in vitro* denominado de Evolução Sistemática de Ligantes por Enriquecimento Exponencial (SELEX) (CHAMBERS et al. 2008).

### 2.5.2.2 Quanto ao sistema transdutor

Os biossensores conforme princípios de transdução são (LIMA, 2010):

a) Óptico: são baseados no princípio de transdução como a absorvância, refletância, luminescência, fluorescência, índice de refração efeitos fototérmicos e espalhamentos da radiação, em variações colorimétricas. Neles, a resposta analítica é determinada pela alteração das propriedades ópticas do agente de biorreconhecimento imobilizado em suporte quando há interação com a espécie a ser determinada.

b) Piezoelétricos: transformam variações de massa de uma determinada superfície em sinais elétricos. Técnicas de transdução utilizando micro balança de cristal de quartzo (QCM) e microscopia de força atômica (AFM) são utilizadas nesse tipo de sensor;

c) Termométricos: medem o calor absorvido ou liberado por reações químicas ou adsorções que envolvam o analito;

d) Eletroquímicos: transformam o efeito de interações eletroquímicas entre analito e eletrodo em sinais elétricos. Esses dispositivos envolvem as técnicas de: potenciometria, voltametria e espectroscopia de impedância, entre outras. Esses transdutores são frequentemente empregados em biossensores de DNA;

e) Magnéticos: baseados em medidas de alteração nas propriedades paramagnéticas de matrizes gasosas, como oxigênio. É realizada marcação em biomoléculas com microesferas magnética e a detecção, geralmente, é feita pela técnica de magnetorresistência gigante.

Os biossensores eletroquímicos por sua vez são considerados mais atrativos em relação aos demais tipos de biossensores, devido às suas várias vantagens, tais como alta seletividade, especificidade, baixo custo, fácil manuseio, diagnóstico rápido e possibilidade de miniaturização do sistema (SIDDQUEE et al, 2010; NASCIMENTO et al, 2012; TELES & FONSECA, 2008).

A transdução eletroquímica é baseada no fato de que durante o processo de biointeração, as espécies eletroquímicas (elétrons) são consumidas ou geradas, produzindo um sinal eletroquímico captado e traduzido em sinal mensurável. Os biossensores eletroquímicos podem ser de três tipos: potenciométricos, amperométricos e condutimétricos (CARDOSO, 2007):

a) Potenciométricos: baseiam-se na medida do potencial elétrico gerado na interface solução/sensor na qual estariam presentes na solução, espécies aptas a interagir com a superfície do sensor. Como exemplo, os eletrodos íons seletivos;

b) Amperométricos: são sensores baseados na medida de corrente elétrica. Nesta técnica é aplicado um potencial fixo suficiente para efetivação de um processo redox na célula eletroquímica. E para as análises quantitativas, determina-se que quanto menor e mais próximo de zero for o potencial, menores serão os problemas relacionados a interferentes. Sendo este conceito também aplicável aos biossensores voltamétricos;

c) Voltamétricos: constituem os sensores que se baseiam em análises quantitativas e qualitativas na caracterização e no estudo de mecanismo de oxidação e redução. São monitorados os níveis de corrente em função do potencial. E a faixa de varredura é escolhida de acordo com o objetivo.

## **2.6 Biossensores eletroquímicos de ácidos nucleicos**

O uso de um biossensor eletroquímico para a detecção de sequências de ácidos nucleicos com base em processo de hibridação (formação de dupla hélice de DNA por

complementariedade das bases nitrogenadas) pode reduzir significativamente o tempo de ensaio e simplificar o protocolo, o que permite a detecção de ácidos nucleicos em quase tempo real (SOUZA et al., 2011; KARAMOLLAOGLU et al., 2009; SOUZA et al., 2009; HEJAZI, et al., 2008 ). A resposta eletroquímica sensível é baseada na oxidação direta de ácidos nucleicos, ou indiretamente pela reação redox de moléculas indicadoras de hibridização, como indicadores químicos (SOUZA et al., 2011). A utilização de biossensores de ácidos nucleico pode ser vista em pesquisas envolvidas na detecção de doenças como: Papilomavirus Bovino (NASCIMENTO et al., 2012); Dengue (SOUZA et al., 2011); Vírus da imunodeficiência Humana (TRAN et al., 2011), Papilomavirus Humano (WANG et al., 2009), entre outras.

A detecção direta do DNA é geralmente baseada na oxidação da guanina, devido à sua maior capacidade eletroativa, comparadas aos demais nucleotídeos. (MUTI et al., 2012).

Inicialmente, o biossensor de ácidos nucleicos é feito a partir da imobilização de uma sequência de DNA (sonda) na superfície transdutora, visando o reconhecimento de sua sequência complementar (alvo) (NASCIMENTO et al, 2012; LABUDA et al., 2010; SOUZA et al., 2011). A imobilização da sonda na superfície transdutora pode ser feita por diversos métodos, tais com adsorção, ligação cruzada, encapsulamento, por complexo da avidina-biotina ou ligação covalente (WANG et al., 2008; NASCIMENTO et al, 2012).

Diante no exposto, nós propusemos através desse trabalho, a detecção de sequência de DNA de *Leishmania* sp. através da modificação de eletrodo de grafite com sequência complementar deste parasita.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Geral**

Desenvolver um sistema eletroquímico de DNA para detecção de *Leishmania* sp.

#### **3.2. Específicos**

a) Imobilizar a sonda específica de ácidos nucleicos diretamente sobre superfície de eletrodo de trabalho;

b) Estudar a melhor concentração de sonda de DNA para imobilização na superfície do eletrodo de trabalho;

b) Estudar as condições para o processo de hibridização entre a sonda imobilizada e sequência complementar;

c) Realizar testes de especificidade com outras sequências de ácidos nucleicos não específicas para *Leishmania* sp.

#### 4. REFERÊNCIAS

ASSIS, T. et al. **Validação do teste imunocromatográfico rápido IT-LEISH para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana.** Epidemiol. Serv. Saúde 2008, 17(2), 107-116.

BERNARDO, A.R. **Tecnologia IgY: Produção de anticorpos aviários para Leishmania (Leishmania) amazonenses com uso ético dos animais de experimentação.** 2009. 49f. Dissertação – (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana.** Brasília, 2010. Disponível em: <[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_vigilancia\\_leishmaniose\\_tegumentar\\_americana.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar_americana.pdf)> Acesso em: 20 fev. 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de recomendações para o diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a co-infecção Leishmania - HIV.** Brasília, 2011. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/leishmania\\_hiv\\_web\\_25\\_01\\_11.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/leishmania_hiv_web_25_01_11.pdf)>. Acesso em: 17 de fev. 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Eletrônico Epidemiológico,** 2010. Brasília, Abr. 2010. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/ano10\\_n02\\_sit\\_epidemiol\\_zoonoses\\_br.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/ano10_n02_sit_epidemiol_zoonoses_br.pdf)>. Acesso em: 17 de Fev. 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Atlas de leishmaniose tegumentar americana: diagnósticos clínico e diferencial.** Brasília, 2006. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/atlas\\_lta.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/atlas_lta.pdf)>. Acesso em 17 de fev. 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica.** Brasília, 2009. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/gve\\_7ed\\_web\\_atual.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/gve_7ed_web_atual.pdf)>. Acesso em: 17 fev. 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Relatório de situação: Pernambuco.** Brasília, 2011. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/4\\_pernambuco\\_final.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/4_pernambuco_final.pdf)>. Acesso em: 17 fev. 2013.

CARDOSO, J.L. **Desenvolvimento de sistemas: portáteis de monitoramento eletroquímico**. 2007. 146f. Dissertação – (Mestrado em Engenharia Elétrica) – Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL & PREVENTION (2006). Disponível em:<<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/default.htm>> Acesso em: 22 de jan. 2013.

CHAMBERS, J. et al. Biosensor recognition elements. *Curr. Iss. Mol. Biol.* 2008, 10, 1-12.

COSTA, P.L. **Comportamento da fauna de flebotomíneo, com ênfase em *Lutzomia longipapis*, em área endêmica para Leishmaniose Visceral, Agreste de Pernambuco**. 2011. 92f. Dissertação - (Mestrado Acadêmico em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2011.

FIOCRUZ. (2013) Disponível em:<<http://www.fiocruz.br/ccs/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=353&sid=6>>. Acesso em: 22 de fev. 2013.

GÓES, M.A.O.; MELO, C.M.; JERALDO, V.L.S. **Série temporal da leishmaniose visceral em Aracaju, estado de Sergipe, Brasil (1999 a 2008): aspectos humanos e caninos**. *Rev. bras. epidemiol.* 2012, 15(2), 298-307.

HANG, K.; LIANG, Z.; ZHOU, N. **Design strategies for aptamer-based biosensors**. *Sensors* 2010, 10, 4541-4557.

HEJAZI, M.S. et al. **Construction, electrochemically biosensing and discrimination of recombinant plasmid (pEThIL-2) on the basis of interleukine-2 DNA insert**. *Biosens.Bioelectron.* 2008, 23, 1588-1594.

KARAMOLLAOĞLU, H.A.; OKTEM, M.M. **QCM-based DNA biosensor for detection of genetically modified organisms (GMOs)**. *Biochem. Eng. J.* 2009, 44, 142-150.

LABUDA, J. et al. **Electrochemical nucleic acid-based biosensors: Concepts, terms, and methodology (IUPAC Technical Report)**. *Pure Appl. Chem.* 2010, 82(5), 1161-1187.

LAKHAL, S. et al. **Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay based on crude *Leishmania* histone proteins for serodiagnosis of human infantile visceral leishmaniasis**. *Clin. Immunol. Vaccine* 2012, 19(9), 1487-1491.

LI, F.; HAN, X.; LIU, S. **Development of an electrochemical DNA biosensor with a high sensitivity of fM by dendritic gold nanostructure modified electrode.** Biosens. Bioelectron. 2011, 26, 2619-2625.

LIMA, R.S. **Biossensor condutométrico sem contato em microchip contendo ácido fólico como biorreceptor.** 2010. 138 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

LIU, F.; CHOI, J.Y., SEO, T.S. **Graphene oxide arrays for detecting specific DNA hybridization by fluorescence resonance energy transfer.** Biosens. Bioelectron. 2010, 25, 2361-291.

MAJIDI, M.R. GHOLIZADEH, S.M. HEJAZI, S. **Immobilization of lactate as an electroactive indicator on pencil graphite electrode for the development of a new electrochemical biosensor for the detection of lactate dehydrogenase.** J. Iran. Chem. Soc. 2011, 8, 59.

MELO, A.F. **Desenvolvimento preliminar de um biossensor enzimático para determinação de taninos hidrolisáveis.** 2008. 104f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

MISSAWA, N.A.; LOROSA, E. S.; DIAS, E.S. **Prevalência alimentar de Lutzomia longipalpis (Lutz & Neiva, 1912) em área de transmissão de leishmaniose visceral em Mato Grosso.** Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2008, 41(4), 365-368.

MOHAN, S.et al. **Nano-structured nickel oxide based DNA biosensor for detection of visceral leishmaniasis (Kala-azar).** Analyst. 2011, 136, 2845-2851.

MOTA, L.A.A.; MIRANDA, R. R. **Manifestações dermatológicas e Otorrinolaringológicas na Leishmaniose.** Arq. Int. Otorrinolaringol. 2011, 15(3), 376-381.

MUTI, M.; KURALAY, F.; ERDEM, A. **Single-walled carbono nanotubes-polymer modified grafite electrode for DNA hybridization.** Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 2012, 77, 77-83.

NAKKASH-CHMAISSE, H.et al. **Detection of leishmania parasites in the blood of patients with isolated cutaneous leishmaniasis.** Inter. Jour. Infec. Diseases 2011, 491-494.

NASCIMENTO, G.A. et al. **Electrochemical DNA Biosensor for Bovine Papillomavirus detection using polymeric Polymeric Film on Screen-printed Electrode.** Biosens. Bioelectron. 2012, 38, 61-66.

NOUGUEIRA, J.L. et al. **A importância da leishmaniose visceral canina para a saúde Pública: uma zoonose reemergente.** Revista científica eletrônica de medicina veterinária. Ano VII – n.13, Garça/SP, 2009.

PERINOTO, A.C. et al. **Biosensors for Efficient Diagnosis of Leishmaniasis: Innovations in Bioanalytics for a Neglected Disease.** Anal. Chem. 2010, 82, 9763-9768.

QUINNELL, R. J.; COURTENAY, O. **Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis.** Parasitology 2009, 136, 1915-1934.

SIDDIQUEE, S.N.A. et al. **Electrochemical DNA biosensor for the detection of specific gene related to Trichoderma harzianum species.** Bioelectrochemistry 2010, 79, 31-36.

SILVA-LÓPES, R.E. **Proteases de Leishmania: novos alvos para o desenvolvimento racional de fármacos.** Quim. Nova 2010, 33(7), 1541-1548.

SONG, K.; LEE, S.; BAN, C. **Aptamers and their biological applications.** Sensors 2012, 12, 612-631.

SOUZA, E.V.M et al. **Development of electrochemical biosensor for virus dengue diagnostic using graphite electrode.** New Biotechnol. 2009, 25, 378.

SOUZA, E.V.M. et al. **Label-Free Electrochemical Detection of the Specific Oligonucleotide Sequence of Dengue Virus Type 1 on Pencil Graphite Electrodes.** Sensors 2011, 11, 5616-5629.

SOUZA, G.F. **Comparação de Aspectos Clínicos e Diagnósticos da Leishmaniose Visceral entre Portadores e não Portadores do Vírus da Imunodeficiência Humana.** 2007. 124f. Dissertação (Mestrado em Infectologia e Medicina Tropical) – Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2007.

STREHLITZ, B.; NIKOLAUS, N.; STOLTENBURG, R. **Protein Detection with aptamer biosensors.** Sensors 2008, 8, 4296-4307.

TELES, F.R.R.; PRAZERES, D.M.F.; LIMA-FILHO, J.L. **Electrochemical detection of a dengue-related oligonucleotide sequence using ferrocenium as a hybridization indicator.** Sensors 2007, 7, 2510-2518.

TRAN, L.D.; NGUYEN, B.H.; HIEU, N.V.; TRAN, H.V.; NGUYEN, H.L.; NGUYEN, P.X. **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 2011, 31, 477-485.

TOLEDO, J.S. et al. **Using genomic information to understand *Leishmania* biology.** The Open Parasitology Journal. 2010, 4, 156-166.

WANG, Y. ET AL. **Electrochemical Sensors for Clinic Analysis.** Sensors 2008, 8, 2043-2081.

YANG, R. et al. **Carbon Nanotube-Quenched Fluorescent Oligonucleotides: Probes that Fluoresce upon Hybridization.** J. Am. Chem. Soc. 2008, 130, 8351–8358.

ZHANG, H., XU, J.-J., CHEN, H.Y. **Shape-Controlled Gold Nanoarchitectures: Synthesis, Superhydrophobicity, and Electrocatalytic Properties.** J. Phys. Chem. C 2008, 112, 13886–13892.

## **5. CAPÍTULO 1**

# **Development of DNA electrochemical system for *Leishmania* sp. detection.**

Para ser submetido ao periódico:  
**Electrochimica Acta**

Development of DNA electrochemical system for *Leishmania* sp. detection.

Wessulla S. B. Ribeiro<sup>ab</sup>, Deborah M. L. Zanforlin<sup>a</sup>, Maria Amélia S. M. Borba<sup>a</sup>, Natália C. Oliveira<sup>a</sup>, Gustavo A. Nascimento<sup>a</sup>; Danielly S. Campos-Ferreira<sup>a</sup>, Mariana S. Arruda<sup>a</sup>, Maria da Paz C. Silva<sup>ab</sup>, José Luiz Lima-Filho<sup>\*ab</sup>.

<sup>a</sup>Laboratory of Immunopathology Keizo Asami, LIKA - Federal University of Pernambuco.  
Recife – PE, Brazil.

<sup>b</sup>Department of Biochemistry - Federal University of Pernambuco. Recife – PE, Brazil.

---

\* Corresponding author. Tel.: 00 + 55 (81) 2126.8484 Fax: 00 + 55 (81) 2126.8485.

E-mail address: joseluiz60@mac.com

## ABSTRACT

Leishmaniasis is a group of diseases caused by protozoa of the genus *Leishmania*, that affecting 88 countries worldwide. The purpose of the present work was to develop an electrochemical DNA biosensor for leishmaniasis diagnosis. The biosensor has been designed with a probe immobilized on the electrode surface graphite pencil for detecting *Leishmania* sp through by analyzing the behavior of electrochemical oxidation of guanine by differential pulse voltammetry. Initially, the electrode was pretreated by applying potential of 1.8 V for 5 min. Immobilization by adsorption of the probe was optimized at 0.5  $\mu$ M with application of 0.5 V for 5 min. The hybridization was carried out with complementary target sequence (*Leishmania* sp target), and the electrochemical signal decreased compared to a *Leishmania* sp. probe (from 263 nA to 113 nA). The target could be quantified in a range from 125  $\mu$ M to 0.5  $\mu$ M. with good linearity and a detection limit of 22.4 pM and relative standard deviation of the 1.09 %. The selectivity was analyzed by hybridization of probe with different sequences (complementary target, non-complementary and mix). The results with sequence target presented a decrease in the guanine signal (from 263 nA to 113 nA), because hybrid formed. However, the interaction with no-complementary target did not lead to a significant decrease in the guanine electrochemical oxidation (209 nA) due to absence of entire hybridization. On the other hand, the interaction between probe and mix (target and non-complementary) sequences showed a current peak similar to the complementary target (112 nA). This demonstrates that the presence of non-complementary sequence did not interfere with the specificity of the biosensor, indicating to be a promising alternative for *Leishmania* sp. detection.

Keywords: Electrochemical biosensor, nucleic acid, pencil graphite electrode, *Leishmania* sp.

## 1. Introduction

Leishmaniasis is a disease caused by a protozoan of the genus *Leishmania*, which affects about 88 countries of tropical or subtropical climate, preferably. An estimated leishmaniasis affects about 12 million people worldwide [1] and that 350 million people are at risk of contamination. Thus, leishmaniasis is considered a public health problem, mainly due to its high incidence in developing countries around than 2 million new cases annually [2]. Transmission occurs when females of the genus *Phlebotomus* insects bite infected humans and other mammals, thereby transmitting the *Leishmania*. Visceral leishmaniasis, the most severe form of the disease can be fatal in untreated individuals [3]

Leishmaniasis is an infection difficult to control because the amount of aspects involved, such as the great biological diversity of parasites, the existence of many species of mammals and vectors that can act as hosts, the different clinical forms of the disease, socioeconomic populations affected, high cost and toxicity of drugs. However, it is possible to control the transmission of leishmaniasis through strategies such as early detection and treatment of infected hosts [3].

Research on the diagnosis leishmaniasis has attracted considerable interest due to endemic situation worldwide [2]. Currently, the diagnosis of cutaneous and visceral leishmaniasis are been made through histological observations of skin and tissue or immunological tests, respectively. These models have limitations such as low sensitivity and selectivity, as well as late diagnosis. Therefore, the treatment of infected patients may be harmed.

Electrochemical DNA biosensors are considered more attractive in comparison with other types of biosensors, due to its high selectivity, specificity, low cost, easy handling, quick diagnosis [4,5], possibility of miniaturization of the system [6,7] and compatibility with electrochemical analysis. A DNA biosensor recognizes a sequence complementary (target)

from a single-stranded DNA (probe) [8,9]. For the construction of a biosensor is done initially immobilization of the one nucleic acid probe with a sequence defined on a surface transducer, via immobilization methods, such as adsorption, crosslinking, encapsulation, an avidin-biotin or a covalent bond [10]. This step critical is essential for the biosensor performance [11]. The use of graphite electrodes has been demonstrated for the development of electrochemical biosensors of nucleic acids [12-15]. Some characteristics such as high sensitivity and low cost are reported on the use of carbon electrodes, particularly where electrodes are used for graphite pencil [16]. Then, the objective of this work, the objective was the development of DNA electrochemical system for *Leishmania sp.* detection.

## 2. Experimental

### 2.1. Materials and reagents

All reagents used were of a high purity. Sodium Acetate and Tris base were purchased from Promega (USA) and sodium acetate was obtained from Sigma (USA). Ultrapure water was used in all solutions. The oligonucleotides were synthesized by Integrated DNA Technologies (USA). The oligonucleotide stock solutions and dilute solutions were prepared with buffer acetate solution (pH 5.0, 0.5 M) and kept frozen. Electrode graphite pencil type 4B was modified and used as a working electrode.

Probe *Leishmania sp.*: 5'CGTCTCAGTGATCCGGGG 3';

Target *Leishmania sp.*: 5' CCCC GGATC ACTGAGACG 3';

Non-complementary: 5' CTGTT CATGG CCCTTGTGG CG 3'

### 2.2. Equipment

System with two electrodes was used in this work. Pencil graphite electrode was used as a work electrode and a silver electrode utilized as reference electrode. The reference electrode was obtained by pin gold immersed in silver ink and dried in an oven at 37°C. Then rinsed with ultrapure water to remove possible contaminants. The apparatus used for electrochemical analysis was PGSTAT Autolab 101 (Metrohm Autolab BV, Netherlands) fitted with Autolab software GPES and 4.9. In electrochemical analysis, it was used acrylic stopping plate accommodating electrodes and cell culture used as an electrochemical cell. Hybridization experiments were performed in termomix comfort (Eppendorff).

### 2.3. Preparation of the Working Electrode

The body of the pencil graphite electrode was cut and polished on one end of the grinding wheel to obtain a smooth surface. The working area of the electrode was surrounded by silicone hose, resulting in workspace 28.50 mm<sup>2</sup>. Subsequently, it was washed with ultrapure distilled water in order to remove possible contaminants.

### 2.4. Electrochemical pretreatment of the PGE and immobilization of the Probe

The polished surface of the working electrode was electrochemically activated out at 1.8 V for 5 minute in acetate buffer solution (pH 5, 0.5 M) [10]. Following activation of the PGE, the probe was immobilized on the electrode by applying fixed potential (+0.5 V vs. Ag reference electrode for 5 min.) in acetate buffer solution (pH 5, 0.5 M) containing different concentration of *Leishmania* probe. The electrode was then rinsed with ultrapure water.

### 2.5. Hybridization of the target DNA

After immobilization of the probe on the electrode surface, hybridization process was performed by immersion of the electrode in 2 mL solution of oligonucleotide complementary

(0.5  $\mu\text{M}$ ), at 67.5°C with agitation of 300 rpm for 5 min. The same protocol was applied for the non-complementary sequences and electrode bare. Detection of the hybridization was performed by analysis of the oxidation peaks of the target in PGE surface. The electrochemical analysis was obtained by using differential pulse voltammetry with analytical method.

## 2.6. Voltammetric Analysis

The electrochemical behavior of the electrode surface was studied using differential pulse voltammetry (DPV) in Tris-HCl buffer (pH 7.0, 20 mM) solution and scanning the electrode potential between 0.5 and 1.2 V at pulse amplitude of 50 mV. Scan rate 20 mV/s were conducted to obtain the electrochemical signals obtained by DNA hybridization probe with its complementary sequence on the surface of the working electrode.

## 2.7 Statistical Approach

The results were analyzed by an analysis of variance (ANOVA) at a significance level of  $p < 0.05$ . All statistical and graphical analyses were carried out with the Statistica 8.0 program (Stat Soft Inc.)

## 3. Results and discussion

### 3.1 Preliminary investigations

In this work, pretreatment of the carbon surface was performed to increase its roughness and hydrophilicity, facilitating the adsorption of the probe on the electrodes [15]. The adsorption technique was used as a method of immobilizing the probe on the surface of PGE. The choice of this immobilization method was due to its simplicity and efficiency, without the need for any special reagents or modifications of nucleic acids. The

immobilization of DNA on the surface PGE was due electrodeposition between the surface of the graphite electrode electropositive and electronegative portion of DNA (phosphate groups), thus resulting in an electrostatic bond. The performance of the biosensor was investigated by means of electrochemical signals generated by oxidation of guanines on the electrode surface after the processes of immobilization and hybridization [9]. The choice of this nitrogenous base is related to their greater capacity electroactive compared to other nucleotides [17] which has been shown in some works as potential of +0.93–1.0 V [18]. Therefore, potential of 0.8 to 1.2 V was determined for the electrochemical analysis in this research.

### 3.2 Effect of the Probe Concentration

The step of immobilization of the probe is essential for effective electrochemical biosensor [19]. The influence of the concentration of the probe in the process of immobilization on the surface of PGE was investigated (Figure 1). The results obtained with the differential pulse voltammetric (DPV) increment signal oxidation of guanine with increasing concentrations up to 0.5  $\mu\text{M}$  and subsequently decrease the electrochemical signal. This phenomenon may be attributed to saturation of the probe above the graphite electrode, resulting in an overlap of the probes which would cause a steric hindrance, reducing the availability of guanine bases. These results show that immobilization of the probe was achieved at different concentrations (0.125 to 2  $\mu\text{M}$ ). However, 0.5  $\mu\text{M}$  has been suggested as the optimal concentration for immobilization of the probe, since it was observed a higher peak current. The data statistically analyzed showed that the concentration 0.5 and 2  $\mu\text{M}$  were different for all the concentrations, and the concentration of 0.250 and 0.750  $\mu\text{M}$  were equals, as well as the concentrations of 0.150 and 1 $\mu\text{M}$ .

### 3.3 Hybridization Detection

The recognition of nucleic acid probe immobilized on the electrode surface identifies nucleic acid sequences complementary, forming a double helix. This identification is specific and effective even in the presence of other sequences non-complementary. After probe immobilization the following step is the hybridization between the probe and complementary sequence. This process depends on specific temperature and time [20, 6]. In this study, the hybridization was done at 67.5 °C, 300 rpm for 5 min. at 70 µL solution the target sequence (0.5 µM). When hybridization occurs, there is a decrease in electrochemical signals corresponding to decrease the amount of oxidized guanines available for oxidation at the electrode surface. This is due to formation of hydrogen bonding between guanine and cytosine, resulting in a lower amount of guanine available to be oxidized [18,21].

In Figure 2 (A) and (B) is shown the results for the guanine electrochemical oxidation in the conditions: 0.5 V in buffer 20 mM Tris-HCl, pH 7. (a) In PGE-modified and activated and after hybridization with (b) complementary oligonucleotides solution, (c) non-complementary solution and (d) mix solution (complementary and non-complementary solution). The oxidization in the condition "a" is due to the presence of guanines which were available for oxidation. Related to the condition "b", there is a significant decrease of the oxidation signal after hybridization, indicating a depletion of guanines available on the electrode surface. In "c", shown that the electrochemical signal after hybridization of the probe with non-complementary sequence increased when compared to the hybrid formed. However, the experiments with a non-complementary sequence showed a current peak slightly lower than the immobilized *Leishmania* probe on the PGE, which was more likely due to the non-specific links between non-complementary sequences [22]. In "d" signal was statistically identical to that one seen in "b", indicating that even in the presence of non-complementary sequence, the probe can recognize its target sequence.

The linear regression was obtained from the electrochemical signal regarding to the

different concentrations of the target (Figure 3). The calibration curve ( $y = 202.57x + 12.571$ ) with correlation coefficient of 0.9975, is linear between 0.035  $\mu\text{M}$  and 0.5  $\mu\text{M}$ . This occurs probably due to the increasing of the target concentration is resulting in a decrease of the electrochemical signal because to saturation of the hybridization process at levels greater than 0.5  $\mu\text{M}$ . The detection limit of 22.4 pM could be estimated by equation:  $\text{LOD} = 3 \sigma/a$  and the quantification limit of 74.6 pM was calculated based on the equation:  $\text{LOD} = 10 \sigma/a$ , according to the standard deviation of the intercept and the slope of the linear regression [23].

Therefore, according to the data obtained, the method proposed was of high sensitivity and with wide detection range, compared to the results of other nucleic acid biosensors (table 1).

The relative standard deviation (RPD%) was 1.09% over three independent probe-modified electrodes which were measured at 0.5  $\mu\text{M}$  of the target, indicating a remarkable reproducibility of the detection method.

#### 3.4. Selectivity Study

The selectivity of the biosensor is represented by the Figure 2(A) and 2(B). The highest guanine oxidation signal was observed with the probe immobilized on PGE. The interaction between the non-complementary oligonucleotide and probe did not lead to a significant decrease in the guanine oxidation due to small portion hybridized, indicated by values of peak currents which were similar to the immobilized probe. Therefore, when the probe forms a double helix with the complementary oligonucleotides occur a decrease in the guanine oxidation current peak, and this does not happen with the interaction between probe and non-complementary sequence. These results confirmed that the electrochemical detection in the present study successfully distinguished complementary and non-complementary sequence.

The selectivity of the biosensor was also examined in a mixture containing both complementary and non-complementary sequences in similar proportions. The mix showed a current peak similar to immobilized probe after hybridization with complementary sequence. This demonstrates that the presence of non-complementary samples did not interfere in the specificity of the biosensor.

#### 4. Conclusions

In this study, DNA immobilized onto electrode surface presented effective discrimination between DNA hybridized and good selectivity and sensitivity. In addition, hybridization process between *Leishmania* sp probe and its complementary (target) resulted in a detection range wide compared with earlier researches of biosensors based in nucleic acid sensor studies. This electrode also showed low detection limit with a satisfactory reproducibility for DNA hybridization. Thus, the data obtained show that the proposed system is feasible for electrochemical detection of DNA sequence related to synthetic *Leishmania* sp. Therefore, the modification of the sequences probably could be used for the diagnosis of other acute infectious diseases with the simple adjustment of annealing temperature of specific sequence.

#### Acknowledgments

We are grateful for the financial support from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); Programa de Bolsas para Reestruturação e Expansão das Universidades Federais (REUNI) and Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA).

#### References

- [1] R.E. Silva-Lópes. Proteases de *Leishmania*: novos salvos para o desenvolvimento racional de fármacos. *Quim Nova* 82 (2010) 1541.
- [2] A.C. Perinoto, R.M. Maki, M.C. Colhone, F.R. Santos, V. Migliaccio, R.K. Daghashtanli, R.G. Stabeli, P. Ciancaglini, F.V. Paulovich, M.C.F de Oliveira, O. N. Oliveira Jr., V. Zucolotto. Biosensores for efficient diagnosis of leishmaniasis: innovations in bioanalysis for a neglected disease. *Anal. Chem.* 82 (2010) 9763.
- [3] A. Chappuis, S. Sundar, A. Hailu, H. Ghalib, S. Rijal, R.W. Peeling, J. Avar, M. Boelaert. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control?. *Nature Rev. Microbiol.* 5 (2007) 172-182.
- [4] F. Li, X. Han, S. Liu. Development of an electrochemical DNA biosensor with a high sensitivity of fM by dendritic gold nanostructure modified electrode. *Biosens. Bioelectron.* 26 (2011) 2619.
- [5] S. Zhang, Z. Wu, G. Shen, R. Yu. A label-free strategy for SNP detection with high fidelity and sensitivity based on ligation-rolling circle amplification and intercalating of methylene blue. *Biosens. Bioelectron.* 24 (2009) 3201.
- [6] G.A. Nascimento, E.V.M. Souza, D.S. Campos-Ferreira, M.S. Arruda, H.M.C. Castelletti, M.S.O. Wanderley, M.H.F. Ekert, D. Brunaska, J.L. Lima-Filho. Electrochemical DNA biosensor for bovine papillomavirus detection using polymeric film on screen-printed electrode. *Biosens. Bioelectron.* 38 (2012) 61.
- [7] S. Siddiquee, N.A. Yusof, A.B. Salleh, F.A. Bakar, L.Y. Heng, Electrochemical DNA biosensor for the detection of specific gene related to *Trichoderma harzianum* species. *Bioelectrochemistry* 79 (2010) 31.
- [8] J. Labuda, A.M. Brett, G. Evtugyn, M. Fojta, M. Mascini, M. Ozsoz, I. Palchetti, E J. Wang. Electrochemical nucleic acid-based biosensors: Concepts, terms, and methodology (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* 82 (2010) 1161.

- [9] E. Souza, G. Nascimento, N. Santana, D. Ferreira, M. Lima, E. Natividade, D. Martins, J.L. Lima-Filho. Label-Free Electrochemical Detection of the Specific Oligonucleotide Sequence of Dengue Virus Type 1 on Pencil Graphite Electrodes. *Sensors* 11 (2011) 5616.
- [10] Y. Wang, H. Xu, J. Zhang, G. Li. Electrochemical Sensors for Clinic Analysis. *Sensors* 8 (2008) 2043.
- [11] J. Wang, S. Zhang, Y. Zhang. Fabrication of chronocoulometric DNA sensor based on gold nanoparticles/poly(l-lysine) modified glassy carbon electrode. *Anal. Biochem.* 396 (2010) 304.
- [12] B. Dogan-Top, S.A. Ozkan. Electrochemical determination of anticancer drug fulvestrant at dsDNA modified pencil graphite electrode. *Electrochim. Acta* 56 (2011) 4433.
- [13] M.H. Pournaghi-Azar, F. Ahour, M.S. Hejazi. Differential pulse voltammetric detection of hepatitis C virus 1a oligonucleotide chain by a label-free electrochemical DNA hybridization biosensor using consensus sequence of hepatitis C virus 1 a probe on the pencil graphite electrode. *Electroanalysis* 21 (2009) 1822.
- [14] M.S. Hejazi, M.H. Pournaghi-Azar, E. Alipour, F. Karimi. Construction, electrochemically biosensing and discrimination of recombinant plasmid (pETHIL-2) on the basis of interleukine-2 DNA insert. *Biosens.Bioelectron.* 23 (2008) 1588.
- [15] R.E. Sabzi, B. Sehatnia, M.H. Pournaghi-Azar, M.S. Hejazi. Electrochemical detection of human papillomavirus (HPV) target DNA using MB on pencil graphite electrode. *J. Iran. Chem. Soc.* 5 (2008) 476.
- [16] B. Dogan-Topal, B. Uslu, S.A. Ozkan. Voltammetric studies on the HIV-1 inhibitory drug Efavirenz: the interaction between dsDNA and drug using electrochemical DNA

biosensor and adsorptive stripping voltammetric determination on disposable pencil graphite electrode. *Biosens. Bioelectron.* 24 (2009) 2358.

- [17] M. Muti, F. Kuralay, A. Erdem. Single-walled carbon nanotubes-polymer modified graphite electrode for DNA hybridization. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 91 (2012) 77.
- [18] E. Palecek, M. Fojta, M. Tomschik, J. Wang. Electrochemical biosensors for DNA hybridization and DNA damage. *Biosens. Bioelectron.* 13 (1998) 621.
- [19] G. Marrazza, I. Chianella, I. M. Mascini. Disposable DNA electrochemical biosensors for environmental monitoring. *Anal. Chim. Acta* 387 (1997) 297.
- [20] J.P. Tosar, K. Kell, J. Laíz. Two independent label-free detection methods in one electrochemical DNA sensor. *Biosens. Bioelectron.* 24 (2009) 3036.
- [21] J. Wang, G. Rivas, J.R. Fernandes, J.L.L Paz, M. Jiang, R. Waymire. Indicator-free electrochemical DNA hybridization biosensor. *Anal. Chim. Acta* 375 (1998) 197.
- [22] M.H. Pournaghi-Azar, M.S. Hejaz, E. Alipour. Detection of human interleukine-2 gene using a label-free electrochemical DNA hybridization biosensor on the basis of a non-inosine substituted probe. *Electroanalysis* 19 (2007) 466.
- [23] M. Gumustas, S.A. Özkan. The role of and the place of method validation in drug analysis using electroanalytical techniques. *Open Anal Chem J.* 5 (2011) 1.
- [24] S. Mohan, P. Srivastava, S.N. Maheshwari, S. Sundar, R. Prakash. Nano structured nickel oxide based DNA biosensor for detection of visceral leishmaniasis (Kala-azar). *Analyst.* 136 (2011) 2845.
- [25] M.S. Hejazi, J. Raoof, R. Ojani, S.M. Golabi, E.H. Asl. Brilliant cresyl blue as electroactive indicator in electrochemical DNA oligonucleotide sensors. *Bioelectrochemistry* 78 (2010) 141.

## Figure captions

Figure 1 - Current peaks of the guanine oxidation signal with different concentrations of DNA probe in pencil graphite electrode activated (0.125  $\mu\text{M}$ , 0.25  $\mu\text{M}$ , 0.5  $\mu\text{M}$ , 0.75 $\mu\text{M}$ , 1.0 $\mu\text{M}$  and 2  $\mu\text{M}$ ). The results were plotted using the means of experiments performed in triplicate.

Figure 2 - (A) Histogram of guanine oxidation and (B) differential pulse voltammograms at (a) DNA probe (0.5  $\mu\text{M}$ ) immobilized on activated PGE before hybridization, (b) DNA probe (0.5  $\mu\text{M}$ ) after hybridization with a complementary sequence (target) (0.5  $\mu\text{M}$ ), (c) with non-complementary sequence (0.5  $\mu\text{M}$ ), and (d) with mixture of complementary target and non-complementary (1  $\mu\text{M}$  each). Voltammetric conditions: Scanning potential steps, 20m V/s. Potential amplitude, 50 mV.

Figure 3 - Plot of difference of guanine oxidation signal of the probe-modified PGE in the absence and presence of the target vs. target concentration. Calibration graph at concentration range 0.035 – 0.5  $\mu\text{M}$  for complementary target.

Table 1. Comparison of proposed biosensor characteristics obtained in this work with other electrochemical.

Figure 1.

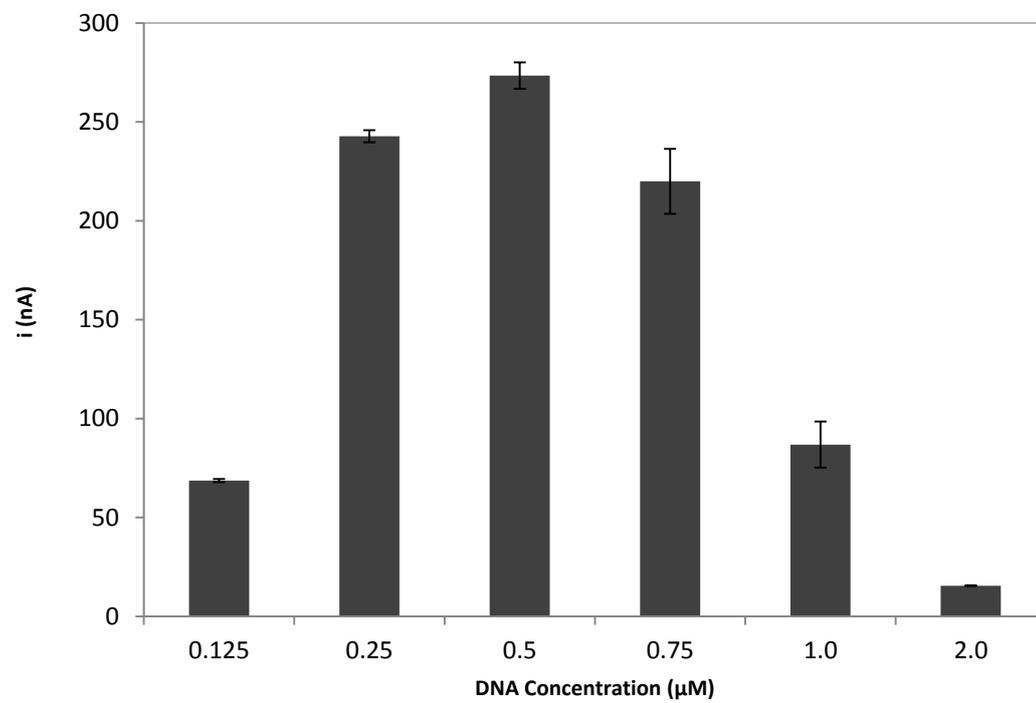


Figure 2(A)

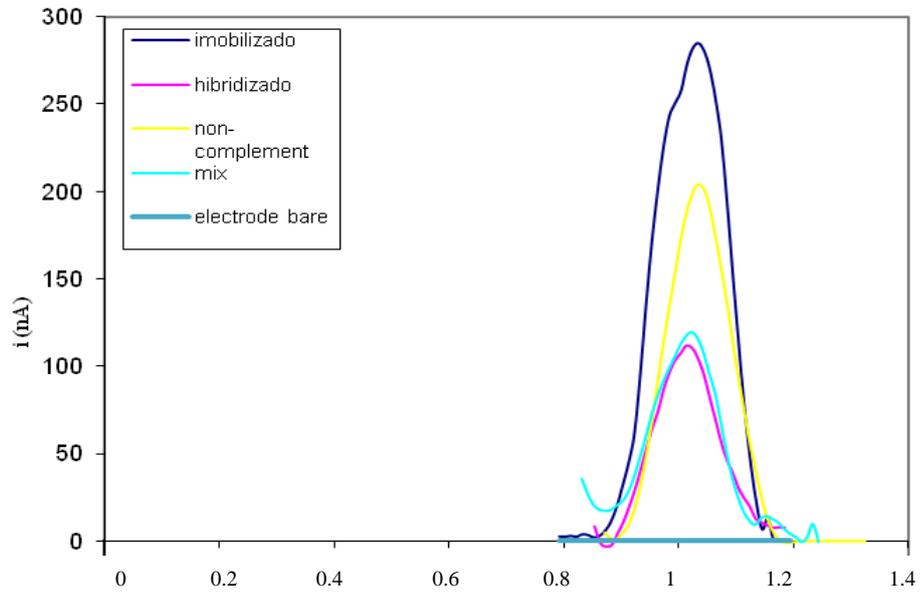


Figure 2(B). In (a) probe, (b) hybridized, (c) non-complementary and (d) mix

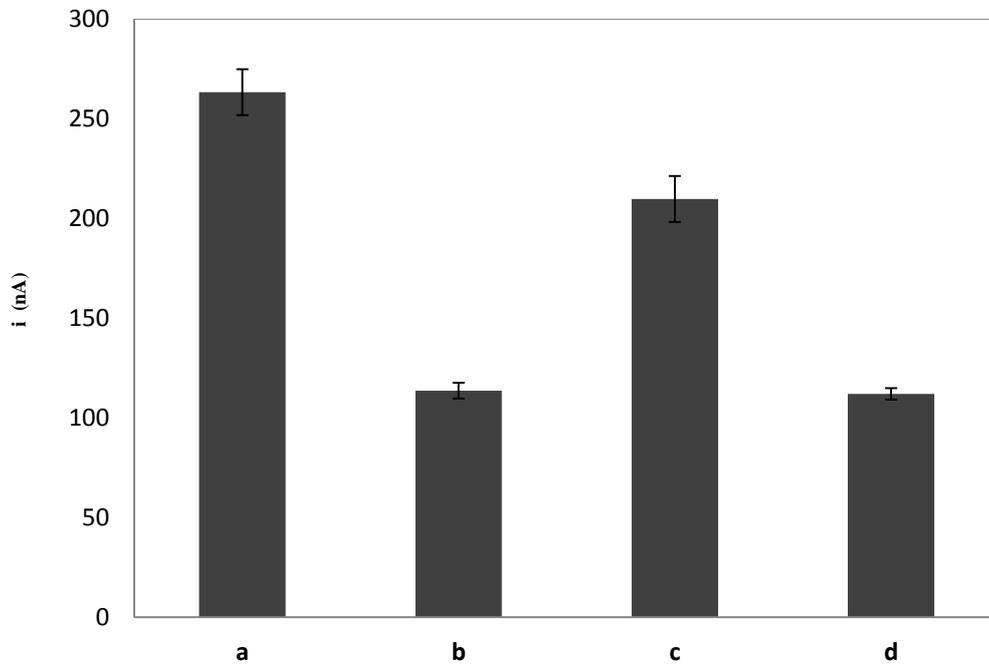


Figure 3

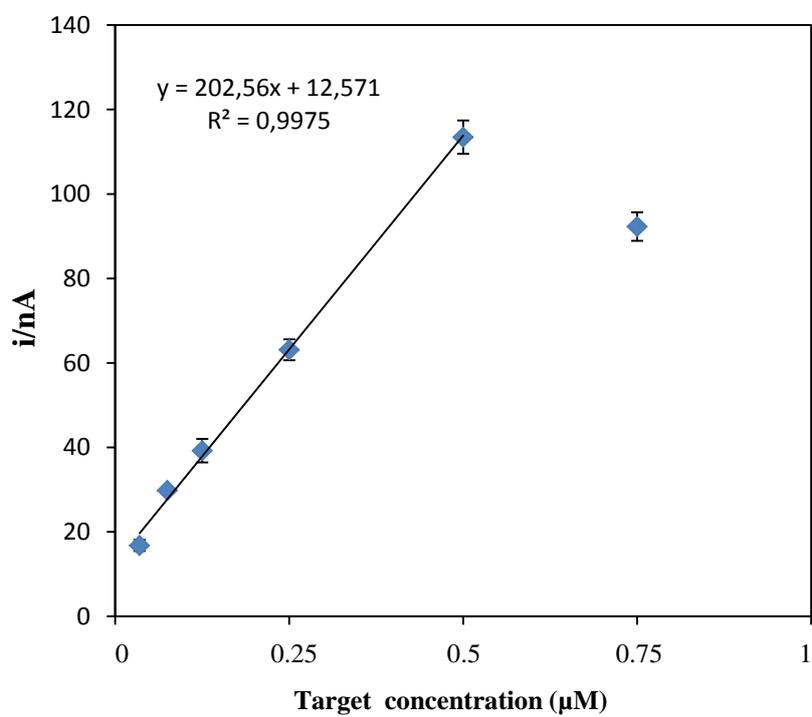


Table 1. Comparison of proposed biosensor characteristics obtained in this work with other electrochemical

Nucleic acid biosensor	Transducer system	Immobilization methods	Electroanalytical methods	Probe length (mm)	Linearity	LOD	Hybridization time	Ref.
Visceral leishmaniasis	Nano structured nickel oxide	Adsorption	DPV	23	2pg/ml - 2µg/ml	2fg/µl	—	[24]
anticancer drug fulvestrant	PGE	Adsorption	CV	—	1.-20 µg/mL	0.30 µg/mL	—	[12]
Oligonucleotide sensors	Carbon past electrode (CPE)	Adsorption	DPV	20	10-5000 nM	9 nM	5 min	[25]
Dengue Virus Type 1	PGE	Adsorption	DPV	18	1-40 nM	0.92 nM	3 min	[9]
Human papilloma virus	PGE	Adsorption	SWV	20	—	1.2 ng/µL	3 min	[15]
Hepatitis C virus	PGE	Adsorption	DPV	20	50-750 nM	6.5 nM	15 min	[13]
Human interleukine-2 gene	PGE	Adsorption	DPV	20	0-500 pg/µL	10.31 pg/µL	15 min	[14]
<i>Leishmania sp</i>	PGE	Adsorption	DPV	22	0.035-0.5 nM	22.4 pM	10 min	—

## 6. CONCLUSÕES

1. Foi encontrada concentração ideal para imobilização da sonda na superfície do PGE, nas condições experimentais realizadas.
2. A seletividade do sistema eletroquímico foi verificada através da detecção da sequência complementar mesmo na presença de sequência não complementar e em solução *mix*.
3. O biossensor mostrou uma boa sensibilidade para a sequência sintética, com limite de detecção baixo e faixa de detecção ampla. Significando que o sistema proposto conseguiu detectar a presença da sequência alvo em pequenas concentrações e em uma ampla faixa de detecção.
4. O biossensor apresentou coeficiente de variação aceitável, de acordo com o padrão verificado em outras literaturas e uma boa reprodutibilidade.