



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE
E BIOTECNOLOGIA DA REDE BIONORTE**



**DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSSENSORES FOTOELETROQUÍMICOS PARA
DETECÇÃO DE *Leishmania (L.) infantum***

SAKAE YOTSUMOTO NETO

São Luís - MA

03/2019

SAKAE YOTSUMOTO NETO

**DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSSENSORES FOTOELETROQUÍMICOS PARA
DETECÇÃO DE *Leishmania (L.) infantum***

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, na UFMA, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. FLÁVIO SANTOS DAMOS.

São Luís - MA

03/2019

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Yotsumoto Neto, Sakae.

DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSSENSORES FOTOELETRÓQUÍMICOS
PARA DETECÇÃO DE *Leishmania L. infantum* / Sakae Yotsumoto
Neto. - 2019.

125 f.

Orientador(a): Flávio Santos Damos.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Rede -
Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia
Legal/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, São Luís,
2019.

1. Imunossensores fotoeletroquímico. 2. Leishmaniose
visceral canina. 3. Óxido de Zinco (ZnO). 4. Sulfeto de
cádmio (CdS). I. Santos Damos, Flávio. II. Título.

SAKAE YOTSUMOTO NETO

**DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSSENSORES FOTOELETROQUÍMICOS PARA
DETECÇÃO DE *Leishmania (L.) infantum***

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, na (UFMA), como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. FLÁVIO SANTOS DAMOS

Banca examinadora

Prof. Dr. Flávio Santos Damos
Departamento de Química - UFMA
Presidente da Banca

Profa. Dra. Maria Del Pilar Taboada Sotomayor
Departamento de Química Analítica – UNESP/Araraquara
Examinador 1 – Externo

Prof. Dr. Cicero Wellington Brito Bezerra
Departamento de Química - UFMA
Examinador 2- Interno

Profa. Dra. Silma Regina Ferreira Pereira
Departamento de Biologia - UFMA
Examinador 3 – Interno

Profa. Dra. Ana Lucia Abreu Silva
Departamento Medicina Veterinária - UEMA
Examinador 4 - Interno

São Luís-MA

03/2019

*Aos meus avós Sakae Yotsumoto & Michiko
Yotsumoto (in memoriam)*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Flávio Santos Damos, pela orientação durante a realização desse trabalho, pela confiança depositada, pela sua amizade e ensinamentos valiosos que me fizeram evoluir como pesquisador.

À Profa. Dra. Rita Luz pelas contribuições significativas e suporte fornecido no decorrer do desenvolvimento do trabalho.

Aos meus pais Toshio Yotsumoto e Tereza de Jesus P. N. Yotsumoto, pela dedicação e amor aos filhos e pela preocupação com a nossa educação.

Aos meus irmãos Kakuey Nunes Yotsumoto, Lhoichi Nunes Yotsumoto e Michika Nunes Yotsumoto, pelos conselhos, ajudas e incentivos na minha vida.

A minha família Yotsumoto, em especial ao meu primo José Reis Neto.

À minha namorada Nataliane Lima, pelo seu amor sincero, pela amizade e companheirismo dedicado a mim.

Aos meus colegas do Laboratório de Sensores, dispositivos e métodos analítico (LabS), que colaboraram direta ou indiretamente para conclusão desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Dênio Emanuel Pires Souto e a Profa. Dra. Héliida Monteiro de Andrade pela colaboração, a qual foi essencial para o desenvolvimento deste trabalho.

À Profa. Dra. Ana Lucia Abreu Silva pela colaboração e a concessão das amostras aqui analisadas.

Aos professores e colegas do curso de pós-graduação de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal BIONORTE.

A todos os amigos e colegas adquiridos durante o curso, e a meus amigos e parceiro do dia a dia, em especial: Marcio, Nonato, Noboru, Junior Bento, André e Carlos Anderson.

E para todos que passaram e ainda estão presentes na minha vida e que contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho.

Ao CNPq e à FAPEMA pelos auxílios financeiros e à CAPES pela bolsa concedida os quais foram essenciais e imprescindível à realização deste trabalho.

“O Nam-myoho-rengue-kyo é a fonte propulsora de toda a atividade universal, o som do grandioso ritmo do Universo e também seu coração e sua essência.” - Daisaku Ikeda

RESUMO

O presente trabalho descreve o desenvolvimento de imunossensores fotoeletroquímicos para a detecção de anticorpos de anti-*Leishmania infantum*. A primeira plataforma é fundamentada em filmes de sulfeto de cádmio eletrodepositados sobre filmes de óxido de zinco previamente eletrodepositados sobre eletrodo de vidro recoberto com óxido de estanho e índio (ITO). O efeito da luz e a cinética de regeneração do agente de sensibilização CdS foram investigadas por microscopia eletroquímica de varredura no modo *feedback*. A plataforma foi modificada com dois diferentes peptídeos (PEP 13 e PEP 16) provenientes de duas diferentes proteínas de alta especificidade e seletividade no reconhecimento de anticorpos de *L. infantum*, o qual foi posteriormente designado como Peps/CdS/ZnO/ITO. O primeiro imunossensor proposto apresentou-se como uma proposta promissora para discriminar amostras de soro canino positivos e negativos. O segundo imunossensor é baseado em antígenos recombinantes de *L. infantum* imobilizados sobre filmes de sulfeto de cádmio sensibilizados com nanopartículas de ouro previamente depositados sobre ITO (AuNP/CdS/ITO). O *bandgap* e o potencial de banda plana da plataforma foram estimados por espectroscopia molecular no UV-vis e espectroscopia de impedância eletroquímica. Os efeitos da natureza, pH e concentração das soluções tampão bem como o efeito do potencial elétrico aplicado sobre a resposta fotoeletroquímica foram também investigados. Em condições otimizadas, a plataforma modificada com os antígenos recombinantes de *L. infantum* (C8/MPA-AuNP/CdS/ITO) apresentou respostas lineares para concentrações dos anticorpos de anti-*L. infantum* compreendidas entre 1 e 300 nmol L⁻¹. Finalmente, o sensor fotoeletroquímico apresentou excelente capacidade de discriminação de amostras reais de soro canino positivos e negativos. Filmes de CdS depositados por banho químico sobre FTO (CdS/FTO) foram aplicados a amostras de soro canino positivos e negativos com o propósito de avaliar a potencialidade dos sistemas fotoeletroquímicos como ferramentas auxiliares em ensaios clínicos. A plataforma CdS/FTO modificada com antígenos recombinantes de *L. infantum* (C8) apresentou 96 % de seletividade clínica e 88 % especificidade clínica.

Palavras-chave: Imunossensores fotoeletroquímico, Sulfeto de cádmio (CdS), Óxido de Zinco (ZnO), Leishmaniose visceral canina.

ABSTRACT

This work describes the development of photoelectrochemical immunosensors for the detection of anti-*Leishmania infantum* antibodies. The first one is based on electrodeposited zinc oxide and cadmium sulphide films on indium tin oxide coated glass slide (CdS/ZnO/ITO). The effects of the light/dark and regeneration kinetics of CdS sensitizer was evaluated by scanning electrochemical microscopy in feedback mode. The platform was modified by using two different peptides (PEP 13 and PEP 16) from two different proteins of high specificity and selectivity in recognition of *L. infantum* antibodies, which was henceforward denoted as Peps/CdS/ZnO/ITO. The proposed photoelectrochemical immunosensor is a cheap and promising alternative to discriminate positive and negative canine serum samples. The second one describes the development of a high sensitive photoelectrochemical immunosensor for the detection of anti-*Leishmania infantum* antibodies. The proposed sensor is based on recombinant *L. infantum* antigens and cadmium sulphide films sensitized with gold nanoparticles deposited on indium tin oxide coated glass slide (AuNP/CdS/ITO). The bandgap and flatband characteristics of AuNP/CdS platform were evaluated by UV-Vis spectrophotometry and electrochemical impedance spectroscopy. The effects of the nature, concentration and pH of the buffer solution as well as the effects of the applied potential on the response of photoelectrochemical platform to a donor molecule were also investigated. Under optimized conditions, the AuNP/CdS/ITO platform modified with recombinant *L. infantum* antigens (C8/MPA-AuNP/CdS/ITO) shows a linear response range from 1 up to 300 nmol L⁻¹ to anti-C8 antibodies. Finally, the capability of the proposed photoelectrochemical immunosensor to discriminate positive and negative canine serum samples was evaluated in real canine serum samples. CdS films obtained by chemical bath deposition were applied to positive and negative canine samples aiming the evaluation of photoelectrochemical devices as auxiliary systems for clinical assays. The *L. infantum* (C8) recombinant antigens modified CdS photoelectrochemical platform presented clinical selectivity and sensitivity of 96% and 88%, respectively.

Keywords: Photoelectrochemical Immunosensor, cadmium sulphide, zinc oxide (ZnO), Visceral leishmaniasis.