



**Ana Inês Relvinha dos Reis**

Licenciada em Bioquímica

## **Desenvolvimento de um teste de diagnóstico rápido para a deteção de malária em amostras clínicas**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Bioquímica

### **Orientadores**

Professor Doutor Ricardo Franco, FCT-UNL

Professora Doutora Elvira Fortunato, FCT-UNL

Doutora Inês Gomes, IMM

Júri:

Presidente: Professor Doutor Pedro Tavares

Arguente: Doutor Miguel Prudêncio

Vogal: Professor Doutor Ricardo Franco



**Outubro de 2015**





**Ana Inês Relvinha dos Reis**

Licenciada em Bioquímica

**Desenvolvimento de um teste de diagnóstico rápido  
para a deteção de malária em amostras clínicas**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Bioquímica

**Orientadores:**

Doutor Ricardo Franco, FCT-UNL

Doutora Elvira Fortunato, FCT-UNL

Doutora Inês Gomes, IMM

Júri:

Presidente: Professor Doutor Pedro Tavares

Arguente: Doutor Miguel Prudêncio

Vogal: Professor Doutor Ricardo Franco



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**Outubro, 2015**



**“Desenvolvimento de um teste de diagnóstico rápido para deteção de malária em amostras clínicas”**

Copyright © em nome de Ana Inês Relvinha dos Reis, da Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



## Agradecimentos

Os meus agradecimentos são dirigidos às pessoas e à instituição que contribuíram para o meu sucesso a nível académico e para a minha felicidade.

Quero agradecer à Universidade Nova de Lisboa – Faculdade de Ciências e Tecnologia, uma grande faculdade cheia de bons profissionais onde tive a oportunidade de ter professores excelentes e dedicados aos alunos.

Ao Professor Doutor Ricardo Franco, por me ter dado a oportunidade de realizar a minha dissertação de mestrado no seu laboratório, o BionanoLab. Quero agradecer todo o tempo disponibilizado para me orientar e por todos os conhecimentos transmitidos ao longo destes meses.

À Doutora Inês Gomes, por toda a ajuda que sempre me deu no laboratório ao longo do projeto, pela partilha de conhecimento e por todo o tempo que disponibilizou para mim. Sempre incansável e preocupada. E acima de tudo uma excelente pessoa e uma amiga.

Quero também prestar o meu agradecimento à Professora Doutora Elvira Fortunato pela colaboração estabelecida com o CENIMAT-I3N.

Aos colegas de laboratório, Maria João, Amélia, António, Hugo, João, Catarina, Agata, Michal, Konrad e Mariana. Eles tornaram todos estes meses mais divertidos, contribuindo à sua maneira para o bom ambiente no laboratório e espírito de entre ajuda vivenciados.

Obrigada às minhas amigas, Lara, Raquel, Elisabeth e Cláudia. Sem elas nada disto teria sido igual. Tinha acabado a faculdade? Tinha! Mas não era a mesma coisa! Com vocês ao meu lado tudo foi muito melhor.

Obrigada à minha família, à minha mãe, ao meu irmão e aos meus avós por todo o apoio e carinho que sempre me deram, sem vocês nada disto teria sido possível. Obrigada à Ceu, à Catarina e ao Tó, a minha segunda família, por todo o carinho e apoio ao longo destes anos. Obrigada também à Debora por toda a amizade.

Obrigada ao Ricardo por todo o apoio incondicional que me deu ao longo do meu percurso académico.



## Resumo

A malária é uma doença infecciosa transmitida através da picada de um mosquito fêmea *Anopheles* infetado com o parasita protozoário do género *Plasmodium* (*P.*), sendo o *P. falciparum* a espécie mais mortal. É responsável pela morte de milhares de pessoas por ano, nomeadamente nos países em vias desenvolvimento, países esses que não detêm as condições necessárias para a prática da microscopia ótica em larga escala, que continua nos dias de hoje a ser a técnica de eleição para o diagnóstico da doença. A conceção de testes de baixo custo e de fácil utilização tais como os testes de diagnóstico rápido (TDR) são uma mais-valia no diagnóstico deste tipo de doenças. A presente dissertação centra-se no desenvolvimento de um TDR num formato competitivo, baseado em nanopartículas de ouro (AuNP) funcionalizadas com ácido mercaptoundecanoico (MUA) ou com o pentapéptido Cys-Ala-Leu-Asn-Asn (CALNN) e conjugadas com um anticorpo monoclonal anti-*PfHRP2* que reconhece especificamente a proteína rica em histidina 2 produzida pelo *P. falciparum* (*PfHRP2*). Para isso, utilizou-se uma tecnologia inovadora na conceção do TDR, a tecnologia *lab on paper*, que utiliza o papel *Whatman* nº1. Os estudos de estabilidade de AuNP funcionalizadas com citrato de sódio, MUA ou CALNN por variação da força iónica e pH do meio mostraram que o pentapéptido CALNN é o agente de revestimento mais resistente a oscilações de força iónica, comparativamente com o citrato de sódio e o MUA e que apenas as AuNP revestidas com citrato de sódio atingiram o ponto de agregação ao pKa da molécula de revestimento.

Os principais resultados obtidos aquando do desenvolvimento do TDR revelaram que o valor de diluição ótica de anticorpo anti-IgG (solução mãe a 11 mg.mL<sup>-1</sup>) imobilizado na linha de controlo é de 1:40 e 1:90, utilizando para deteção os bionanoconjugados AuNP-MUA-Anticorpo e AuNP-CALNN-Anticorpo, respetivamente. Com a aplicação da solução AuNP-CALNN-Anticorpo visualizou-se o aparecimento de cor vermelha na linha de teste, o que demonstra a deteção do antigénio pelos bionanoconjugados. A deteção ocorreu com a aplicação de 2,5 µL de *PfHRP2* a 1,5 mg.mL<sup>-1</sup>. Numa análise global após a aplicação de culturas de sangue não infetadas ou infetadas com o parasita da malária, obteve-se cor na linha de controlo com uma diluição de 1:20 do anticorpo anti-IgG imobilizado. Em relação à linha de teste, na presença de culturas não infetadas, obteve-se sinal na mesma aplicando bionanoconjugados AuNP-MUA-Anticorpo e 2,5 µL de *PfHRP2* a 2,6 mg.ml<sup>-1</sup>.

**Palavras-chave:** Malária, TDR, tecnologia *lab on paper*, *PfHRP2*, anticorpo monoclonal, bionanoconjugados.



## Abstract

Malaria is an infectious disease transmitted through a female *Anopheles* mosquito bite infected with protozoan parasites of the genus *Plasmodium* (*P.*), being the *P. falciparum* the most deadly specie. It is responsible for the deaths of thousands of people every year, especially in developing countries which do not have the proper conditions for the practice of optical microscopy. This practice still continues to be the gold standard technique for parasite diagnosis. The low cost design and easy-to-use tests such as the rapid diagnostic test (RDT) are a great asset for the diagnosis of these kind of diseases. This dissertation focuses on the development of a RDT in a competitive format, based on gold nanoparticles (AuNP) functionalized with mercaptoundecanoic acid (MUA) or with the pentapeptide Cys-Ala-Leu-Asn-Asn (CALNN) and conjugated with the monoclonal antibody anti-*Pf*HRP2 that specifically recognizes the protein rich in histidine 2 produced by *P. falciparum* (*Pf*HRP2). For this purpose, it was employed a groundbreaking technology in the conception of the RDT, the lab on paper technology, which uses Whatman paper no. 1. The stability studies of AuNP functionalized with sodium citrate, MUA or CALNN by varying the ionic strength and pH of the medium showed that the pentapeptide CALNN is the coating agent more resistant to the ionic strength variations when compared to sodium citrate and MUA. The studies also indicated that AuNP coated with sodium citrate reached the aggregation point at the coating molecule pKa. The main results when developing the RDT showed that the optimal value for the dilution of the antibody anti-IgG (stock solution of 11 mg.mL<sup>-1</sup>) immobilized in the control line was 1:40 and 1:90, using the bionanoconjugate AuNP-MUA-Antibody and AuNP-CALNN-Antibody for detection, respectively. Through the application of AuNP-CALNN-antibody, a red color was visualized in the test line, showing the antigen detection by the bionanoconjugate. The detection occurred through application of 2.5 µL of *Pf*HRP2 at 1.5 mg.mL<sup>-1</sup>. On an overall analysis, after the infected and non-infected blood cultures with the malaria parasite were applied, it was possible to detect a red color in the control line with a 1:20 dilution of the immobilized anti-IgG antibody. As for the test line, in the presence of non-infected cultures, detection was accomplished using the bionanoconjugate AuNP- MUA-Antibody and 2.5 µL of *Pf*HRP2 at 2.6 mg.mL<sup>-1</sup>.

**Key-words:** Malaria, RDT, lab on paper technology, *Pf*HRP2, monoclonal antibody, bionanoconjugate



# Índice

<b>Agradecimentos</b> .....	<b>III</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>V</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>VII</b>
<b>Índice</b> .....	<b>IX</b>
<b>Índice de Figuras</b> .....	<b>XI</b>
<b>Índice de tabelas</b> .....	<b>XV</b>
<b>Lista de abreviaturas, siglas e símbolos</b> .....	<b>XVII</b>
<b>1 Enquadramento e objetivos</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Introdução</b> .....	<b>3</b>
2.1 A Malária .....	3
2.2 Ciclo de vida do parasita.....	4
2.3 Fármacos anti maláricos .....	5
2.4 Métodos de diagnóstico .....	6
2.4.1 Diagnóstico clínico .....	7
2.4.2 Diagnóstico laboratorial .....	7
2.4.3 Diagnóstico molecular .....	8
2.4.4 Diagnóstico por testes de diagnóstico rápido.....	9
2.5 Proteína rica em histidina 2 .....	10
2.5.1 Outros antigénios do género <i>Plasmodium</i> .....	11
2.6 Anticorpos.....	11
2.7 Testes imunocromatográficos de fluxo lateral.....	14
2.7.1 Formato sandwich .....	15
2.7.2 Formato competitivo .....	16
2.7.3 Formato de múltipla deteção.....	17
2.8 A tecnologia <i>lab on paper</i> e suas aplicações em TDR .....	18
2.9 Nanopartículas de ouro como biomarcadores em imunoensaios .....	20
2.10 TDR baseado em bionanoconjugados.....	25
<b>3 Procedimento Experimental</b> .....	<b>27</b>
3.1 Síntese de nanopartículas de ouro.....	27
3.1.1 Caracterização das nanopartículas de ouro .....	28
3.2 Funcionalização das nanopartículas de ouro com MUA ou CALNN.....	29
3.3 Formação dos bionanoconjugados.....	29
3.4 Estabilidade das AuNP funcionalizadas e dos bionanoconjugados .....	30
3.4.1 Variação da força iónica do meio.....	30
3.4.2 Variação do pH do meio .....	31
3.5 Produção, expressão e purificação da proteína <i>PfHRP2</i> .....	31
3.6 Projecção do TDR recorrendo à tecnologia lab-on-paper .....	33

3.6.1 Evolução do TDR.....	34
3.6.2 Princípio teórico do TDR.....	35
3.6.3 Otimização da zona de aplicação dos bionanoconjugados.....	36
3.6.4 Otimização da linha de controlo .....	36
3.6.5 Otimização da linha de teste .....	37
3.6.6 Otimização da zona de aplicação das culturas infetadas e não infetadas .....	37
3.7 Preparação do papel <i>Whatman</i> nº1 para análise por microscopia eletrónica de varrimento.....	38
<b>4 Apresentação e Discussão de Resultados.....</b>	<b>41</b>
4.1 Síntese e caracterização de nanopartículas de ouro .....	41
4.2 Funcionalização de AuNP com MUA ou CALNN.....	42
4.3 Formação dos bionanoconjugados.....	43
4.4 Caracterização de AuNP de 52 nm.....	44
4.5 Estabilidade das nanopartículas e bionanoconjugados .....	45
4.5.1 Variação da força iónica.....	45
4.5.2 Variação do pH .....	47
4.6 Produção, expressão e purificação da proteína <i>PfHRP2</i> .....	49
4.7 Ensaio imunocromatográfico em papel de filtro.....	51
4.7.1 Otimização do volume de bionanoconjugados na sua zona de aplicação .....	52
4.7.2 Otimização da linha de teste .....	52
4.7.3 Otimização da linha de controlo .....	55
4.8 Aplicação de culturas não infetadas e infetadas com o parasita da malária utilizando bionanoconjugados formados com AuNP de 17 nm .....	58
4.9 Aplicação de culturas não infetadas e infetadas com o parasita da malária utilizando bionanoconjugados formados com AuNP de 52 nm .....	69
4.10 Ensaio imunocromatográfico em papel de fotocópia .....	71
<b>5 Conclusões e Perspetivas Futuras .....</b>	<b>75</b>
5.1 Conclusões.....	75
5.2 Perspetivas futuras .....	77
<b>6 Referências Bibliográficas .....</b>	<b>79</b>
<b>Anexos .....</b>	<b>83</b>
A Eletroforese.....	83
A1 Preparação das amostras .....	84
B Quantificação de proteínas pelo método do ácido bicinonónico.....	85
B1 Determinação da concentração da proteína <i>PfHRP2</i> pelo método do BCA .....	85
C Espectroscopia de UV-Visível.....	87
D Microscopia eletrónica de varrimento .....	88
E1 AuNP-MUA-Anticorpo.....	89
E2 AuNP-CALNN-Anticorpo .....	90

## Índice de Figuras

<b>Figura 2.1</b> – Mosquito fêmea Anopheles. Retirado de <a href="http://scientistsagainstmalaria.net/vector/anopheles-vector">http://scientistsagainstmalaria.net/vector/anopheles-vector</a> , consultado a 15.05.2015. ....	3
<b>Figura 2.2</b> – Mapa-mundo evidenciando áreas de malária endémica a vermelho. Retirado de <a href="http://www.mercycorps.org/articles/thoughts-world-malaria-day">http://www.mercycorps.org/articles/thoughts-world-malaria-day</a> , consultado a 7.08.2015. ....	3
<b>Figura 2.3</b> - Ciclo de vida do parasita da malária, no hospedeiro e no mosquito. Nas caixas de fundo branco encontram-se o número estimado de parasitas existentes em cada fase do ciclo do parasita. Retirado de [2]. ....	5
<b>Figura 2.4</b> – Estrutura do fármaco quinina. ....	5
<b>Figura 2.5</b> – Estrutura do fármaco cloroquina. ....	5
<b>Figura 2.6</b> – Estrutura do fármaco artemisinina. ....	6
<b>Figura 2.7</b> – Amostra de sangue com a coloração de Giemsa. As setas a preto indicam dois glóbulos vermelhos que contêm o parasita da malária. Retirado de <a href="http://www.cdc.gov/malaria/diagnosis_treatment/diagnosis.html">http://www.cdc.gov/malaria/diagnosis_treatment/diagnosis.html</a> , consultado a 11.05.2015. ....	8
<b>Figura 2.8</b> – TDR para o diagnóstico de malária. O teste revela um resultado positivo para infeção por <i>P. falciparum</i> . Retirado de <a href="http://www.cdc.gov/malaria/diagnosis_treatment/rdt.html">http://www.cdc.gov/malaria/diagnosis_treatment/rdt.html</a> , consultado a 5.04.2015. ....	9
<b>Figura 2.9</b> – Modelo teórico da estrutura 3D da proteína HRP2. A magenta estão assinaladas as hélices- $\alpha$ , a azul os coils, a vermelho está assinalado o N-terminal, uma alanina e a amarelo o C-terminal, um aspartato. Código PBD:1L8M. ....	11
<b>Figura 2.10</b> – Estrutura de um anticorpo. Adaptado de <a href="https://www.pacificimmunology.com/resources/antibody-introduction/what-is-an-antibody/">https://www.pacificimmunology.com/resources/antibody-introduction/what-is-an-antibody/</a> , consultado a 5.06.2015. ....	12
<b>Figura 2.11</b> – Esquema de um teste imunocromatográfico em formato sandwich (a). Num resultado positivo a amostra que contém o analito alvo é aplicada na plataforma de aplicação da amostra e migra ao longo do teste, resultando no aparecimento de cor na linha de teste e de controlo (b). Num resultado negativo, a amostra não contém o analito alvo e ao ser aplicada na plataforma de aplicação da amostra, migra ao longo do teste, resultando no aparecimento de cor apenas na linha de teste (c). Adaptado de [26]. ....	16
<b>Figura 2.12</b> – Esquema de um teste imunocromatográfico em formato competitivo (a). Quando a amostra contém o analito alvo e é depositada na plataforma de aplicação da amostra, vai de seguida migrar ao longo do TDR e a linha de teste irá apresentar cor (b). Quando a amostra não contém o analito alvo e é aplicada na plataforma de aplicação da amostra, vai migrar ao longo do TDR e irá ser visualizada cor na linha de controlo e na linha de teste. Adaptado de [26]. ....	17
<b>Figura 2.13</b> – Impressora Xerox ColorQube 8570 (a). Tinteiros de cera sólida (b). Imagem obtida por SEM da superfície do papel Whatman no.1 com e sem impressão de cera solida, em que a verde está representada a impressão a cera e a cinzento as fibras do papel (c). Micrografias óticas da seção transversal do papel antes e depois da difusão de cera por toda a espessura do papel. Para realçar o efeito das barreiras hidrofóbicas foi utilizado um corante vermelho (d). Retirado de [28]. ....	19
<b>Figura 2.14</b> – TDR em papel de filtro ( <i>Whatman</i> nº1). As setas a verde indicam os vários constituintes do teste. Pode-se observar os canais de cera a azul que vão formar barreiras hidrofóbicas, criando canais hidrofílicos. ....	20
<b>Figura 2.15</b> – Esquema do fenómeno de LSPR. Os eletrões livres à superfície da nanopartícula iniciam o seu processo de oscilação devido á interação com a luz incidente. Adaptado de [32]. ....	21
<b>Figura 2.16</b> – Reação de síntese das AuNP pelo método de Kimling. [34]. ....	22
<b>Figura 2.17</b> – Espectros de UV-Visível de uma solução de AuNP não agregada (a vermelho) e agregada (a roxo). A solução não agregada apresenta um máximo de absorvância a 520 nm e a solução agregada a 587 nm. ....	23
<b>Figura 2.18</b> - Ácido mercaptoundecanoico (MUA) ....	23
<b>Figura 2.19</b> – Pentapéptido Cys-Ala-Leu-Asn-Asn (CALNN) ....	24

<b>Figura 2.20</b> – Nanopartícula funcionalizada com diferentes moléculas para diagnóstico e <i>drug delivery</i> .....	24
<b>Figura 2.21</b> – Esquema do TDR desenvolvido. Em (a) apresenta-se um resultado negativo e em (b) um resultado positivo. ....	26
<b>Figura 3.1</b> - Mudanças de cor obtidas durante a síntese de AuNP. A solução amarela corresponde ao ácido tetracloroáurico dissolvido em água mili-Q (a). A solução transparente corresponde ao passo de adição do citrato de sódio (b). A solução vermelha escura corresponde à solução coloidal de AuNP (c). ....	28
<b>Figura 3.2</b> – Representação esquemática do processo de produção e purificação da proteína PfHRP2, desde o crescimento até à determinação da concentração da mesma.....	33
<b>Figura 3.3</b> – TDR impressos em papel de cromatografia Whatman nº1 a serem difundidos numa placa de aquecimento durante 2 minutos a 140°C.....	34
<b>Figura 3.4</b> – TDR impresso em papel de filtro <i>Whatman</i> nº1 (a), TDR após a difusão da cera pelo papel e recorte das linhas de teste e controlo (b), TDR com interruptor (c). ....	34
<b>Figura 3.5</b> – Evolução dos componentes do TDR. 1 – Zona de aplicação dos BNCs, 2 – Linha de controlo, 3 – Linha de teste, 4 – Zona de lavagem, 5 – Zona de deposição das culturas infetadas/não infetadas. ....	35
<b>Figura 3.6</b> – Ilustração do TDR após deposição da solução de BNCs e das gotas de anticorpo secundário e antigénio e do suporte de apoio do teste. ....	37
<b>Figura 3.7</b> – Preparação do papel <i>Whatman</i> nº1 para análise por SEM. ....	38
<b>Figura 3.8</b> – Equipamentos de microscopia eletrónica de varrimento. ....	39
<b>Figura 4.1</b> – Espectro de UV-Visível de AuNP com 17 nm de diâmetro e a uma concentração de 5,70 nM. A banda LSPR encontra-se situada a 520 nm. ....	41
<b>Figura 4.2</b> – Espectro de UV-Visível de soluções AuNP, AuNP-MUA e AuNP-CALNN. ....	43
<b>Figura 4.3</b> – Espectro de UV-Visível de AuNP-CALNN-Anticorpo e AuNP-MUA-Anticorpo. ....	44
<b>Figura 4.4</b> – Espectro de UV-Visível de AuNP com 52 nm de diâmetro e a uma concentração de 0,17 nM. A banda LSPR encontra-se situada a 527 nm. ....	45
<b>Figura 4.5</b> – Razão de agregação de diferentes soluções de nanopartículas de ouro e bionanoconjugados em função da variação da concentração de NaCl.....	47
<b>Figura 4.6</b> - Razão de agregação de diferentes soluções de nanopartículas de ouro e bionanoconjugados em função da variação do pH do meio.....	49
<b>Figura 4.7</b> – Gel de SDS-PAGE a 10%. O gel correu durante 70 min a 150 V. À esquerda encontram-se os marcadores de peso molecular (valores em kDa) e à direita observa-se a banda correspondente à proteína PfHRP2. ....	50
<b>Figura 4.8</b> – TDR para otimização da linha de controlo e de teste (a). TDR para aplicação de culturas não infetadas e infetadas com o antigénio PfHRP2 (b). 1 – Zona de aplicação dos BNCs, 2 – Linha de controlo, 3 – Linha de teste, 4 – Zona de lavagem, 5 – Zona de deposição das culturas infetadas/não infetadas.....	52
<b>Figura 4.9</b> – Deteção da PfHRP2 na linha de teste utilizando bionanoconjugados AuNP-CALNN-Anticorpo (a). Ampliação da linha de teste (b). ....	53
<b>Figura 4.10</b> – Deteção do anti-IgG na linha de controlo utilizando bionanoconjugados AuNP-MUA-Anticorpo. ....	56
<b>Figura 4.11</b> – Deteção do anticorpo anti-IgG na linha de controlo utilizando bionanoconjugados AuNP-CALNN-Anticorpo. ....	57
<b>Figura 4.12</b> – Em a) foi depositado 2,5 µL de PfHRP2 a 1,5 mg.ml <sup>-1</sup> , 2,5 µL de anti-IgG 1:90 e 60 µL de culturas infetadas e 60 µL de BNCs AuNP-CALNN-Anticorpo numa razão de 1:25. Em b) foi depositado 2,5 µL de PfHRP2 a 1,5 mg.ml <sup>-1</sup> , 2,5 µL de anti-IgG 1:40 e 60 µL de culturas infetadas e 60 µL de BNCs AuNP-MUA-Anticorpo numa razão de 1:25. ....	59
<b>Figura 4.13</b> – Simulação de resultados negativos e positivos para infeção por malária utilizando bionanoconjugados AuNP-CALNN-Anticorpo, com uma razão molar de 1:25. Em a) foi depositado 2,5 µL de PfHRP2 a 1,5 mg.ml <sup>-1</sup> , 2,5 µL de anti-IgG 1:20 e 60 µL de culturas e de BNCs. Em b) foi depositado 2,5 µL de PfHRP2 a 1,5 mg.ml <sup>-1</sup> , 2,5 µL de anti-IgG 1:20 e 60 µL	

de culturas concentradas e de BNCs. Em <b>c)</b> foi depositado 2,5 $\mu\text{L}$ de <i>Pf</i> HRP2 a 3,8 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ , 2,5 $\mu\text{L}$ de anti-IgG 1:20 e 60 $\mu\text{L}$ de culturas concentradas e de BNCs.....	61
<b>Figura 4.14</b> – Simulação de resultados negativos e positivos para infeção por malária utilizando bionanoconjugados AuNP-CALNN-Anticorpo, com uma razão molar de 1:25. Aplicou-se no TDR depositado 2,5 $\mu\text{L}$ de <i>Pf</i> HRP2 a 1,5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ , 2,5 $\mu\text{L}$ de anti-IgG 1:20 e 50 $\mu\text{L}$ de culturas e de BNCs. ....	62
<b>Figura 4.15</b> – Simulação de resultados negativos e positivos para infeção por malária utilizando bionanoconjugados AuNP-CALNN-Anticorpo, com uma razão molar de 1:10. Aplicação de 2,5 $\mu\text{L}$ de <i>Pf</i> HRP2 a 1,5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ , 2,5 $\mu\text{L}$ de anti-IgG 1:20 e 60 $\mu\text{L}$ de culturas e de BNCs. ....	63
<b>Figura 4.16</b> – Simulação de resultados negativos e positivos para infeção por malária utilizando bionanoconjugados AuNP-MUA-Anticorpo, com uma razão molar de 1:25. Em <b>a)</b> foi depositado 2,5 $\mu\text{L}$ de <i>Pf</i> HRP2 a 2,6 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ , 2,5 $\mu\text{L}$ de anti-IgG 1:20 e 60 $\mu\text{L}$ de culturas e de BNCs. Em <b>b)</b> foi depositado 2,5 $\mu\text{L}$ de <i>Pf</i> HRP2 a 1,5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ , 2,5 $\mu\text{L}$ de anti-IgG 1:20 e 50 $\mu\text{L}$ de culturas e de BNCs. ....	65
<b>Figura 4.17</b> – Conjunto de TDR em que se obteve resultados negativos para infeção por malária utilizando bionanoconjugados AuNP-MUA-Anticorpo com uma razão molar de 1:25, 2,5 $\mu\text{L}$ de <i>Pf</i> HRP2 a 2,6 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ , 2,5 $\mu\text{L}$ de anti-IgG 1:20 e 60 $\mu\text{L}$ de culturas e de BNCs.....	65
<b>Figura 4.18</b> – Simulação de resultados negativos e positivos para infeção por malária utilizando bionanoconjugados AuNP-MUA-Anticorpo, com uma razão molar de 1:10. Em <b>a)</b> foi depositado 2,5 $\mu\text{L}$ de <i>Pf</i> HRP2 a 1,5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ , 2,5 $\mu\text{L}$ de anti-IgG 1:20 e 60 $\mu\text{L}$ de culturas concentradas e de BNCs. Em <b>b)</b> foi depositado 2,5 $\mu\text{L}$ de <i>Pf</i> HRP2 a 1,5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ , 2,5 $\mu\text{L}$ de anti-IgG 1:20 e 50 $\mu\text{L}$ de culturas e de BNCs. ....	67
<b>Figura 4.19</b> – Simulação de resultados negativos e positivos para infeção por malária utilizando bionanoconjugados AuNP-CALNN-(EDC/NHS)-Anticorpo, com uma razão molar de 1:25. Em <b>a)</b> foi depositado 2,5 $\mu\text{L}$ de <i>Pf</i> HRP2 a 1,5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ , 2,5 $\mu\text{L}$ de anti-IgG 1:20 e 60 $\mu\text{L}$ de culturas e de BNCs. Em <b>b)</b> foi depositado 2,5 $\mu\text{L}$ de <i>Pf</i> HRP2 a 1,5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ , 2,5 $\mu\text{L}$ de anti-IgG 1:20 e 60 $\mu\text{L}$ de culturas concentradas e de BNCs. ....	69
<b>Figura 4.20</b> – Simulação de resultados negativos e positivos para infeção por malária utilizando bionanoconjugados AuNP-MUA-Anticorpo. Em <b>a)</b> foi depositado 2,5 $\mu\text{L}$ de <i>Pf</i> HRP2 a 0,95 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ , 2,5 $\mu\text{L}$ de anti-IgG 1:20 e 50 $\mu\text{L}$ de culturas e de BNCs. Em <b>b)</b> foi depositado 2,5 $\mu\text{L}$ de <i>Pf</i> HRP2 a 0,95 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ , 2,5 $\mu\text{L}$ de anti-IgG 1:20 e 50 $\mu\text{L}$ de culturas concentradas e de BNCs.	70
<b>Figura 4.21</b> – Teste de diagnóstico rápido utilizando papel de fotocópia como substrato. ....	71
<b>Figura 4.22</b> – Imagem de SEM do papel de fotocópia com ampliação de 100 x. Retirado de [52]...	73
<b>Figura 4.23</b> – Imagem de SEM do papel <i>Whatman</i> n°1 com ampliação de 100 x. Análise de SEM efetuada pela pós-doutorada Daniela Gomes do CENIMAT, I3N.....	73
<b>Figura 0.1</b> – Esquema de um gel de poliacrilamida numa tina vertical. Adaptado de <a href="http://www.siumed.edu/~bbartholomew/images/chapter6/F06-21.jpg">http://www.siumed.edu/~bbartholomew/images/chapter6/F06-21.jpg</a> , consultado a 23.06.2015. ....	84
<b>Figura 0.2</b> – Formação do complexo BCA-Cu <sup>+</sup> . Adaptado de [55] .....	85
<b>Figura 0.3</b> – Retra de calibração obtida pelo método de BCA para a quantificação da proteína <i>Pf</i> HRP2 recombinante.....	87
<b>Figura 0.4</b> – Estudo da diluição ótima de anti-IgG a aplicar na linha de controlo utilizando bionanoconjugados AuNP-MUA-Anticorpo. ....	89
<b>Figura 0.5</b> – Estudo da diluição ótima de anti-IgG a aplicar na linha de controlo utilizando bionanoconjugados AuNP-CALNN-Anticorpo. ....	90



## Índice de tabelas

<b>Tabela 2.1</b> - Características dos antígenos pLDH e aldolase. ....	11
<b>Tabela 2.2</b> - Vantagens e desvantagens de anticorpos monoclonais [18].....	13
<b>Tabela 2.3</b> - Vantagens e desvantagens de anticorpos policlonais [18]. ....	13
<b>Tabela 2.4</b> - Vantagens e desvantagens da utilização de testes imunocromatográficos de fluxo [19]. .....	15
<b>Tabela 4.1</b> - Valores de concentração de NaCl aos quais as diferentes soluções de AuNP atingiram o ponto de meia agregação.....	47
<b>Tabela 4.2</b> - Valores de pH aos quais as diferentes soluções de AuNP atingiram o ponto de agregação. .....	48
<b>Tabela 4.3</b> - Concentração da proteína <i>Pf</i> HRP2 obtida através do método do BCA. ....	51
<b>Tabela 0.1</b> - Volume de reagentes a utilizar na preparação dos géis de poliacrilamida em condições desnaturantes. Os volumes apresentados são referentes à preparação de um gel de 10%. ....	84
<b>Tabela 0.2</b> - Volumes em $\mu\text{L}$ de proteína padrão e de solução A+B.....	86
<b>Tabela 0.3</b> – Volumes em $\mu\text{L}$ de proteína HRP2 e de solução A+B. ....	86



## Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

°C	Graus celsius
µL	Microlitro
µm	Micrómetro
2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
Abs	Absorvância
ACTs	Terapias combinadas baseadas em artemisinina, (do inglês, <i>Artemisinin-based combinations therapies</i> )
Ala	Alanina
APS	Persulfato de amônia (do inglês, <i>ammonium persulfate</i> )
Asn	Asparagina
AuNP	Nanopartículas de Ouro (do inglês, <i>gold nanoparticles</i> )
BCA	Ácido bicinconínico (do inglês, <i>bincinconinic acid</i> )
BNCs	Bionanoconjugados
BSA	Albumina do soro de bovino (do inglês, <i>Bovine serum albumin</i> )
C	Concentração
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> ·2H <sub>2</sub> O	Citrato de sódio di-hidratado
CALNN	Pentapéptido Cys-Ala-Leu-Asn-Asn
Cm	Centímetro
Cys	Cisteína
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNase	Desoxirribonuclease
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC	Cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodimida (do inglês, <i>1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide</i> )
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EUA	Estados Unidos da América
HAuCl <sub>4</sub>	Ácido tetracloáurico (do inglês, <i>Tetrachloroauric acid</i> )
HCl	Ácido clorídrico (do inglês, <i>Hydrochloric acid</i> )
His	Histidina
HNO <sub>3</sub>	Ácido nítrico (do inglês, <i>Nitric acid</i> )
HRP2	Proteína rica em histidina 2 (do inglês, <i>Histidine rich protein 2</i> )
IFA	Ensaio de imunofluorescência indireta (do inglês, <i>Indirect immunofluorescence assay</i> )
Ig	Imunoglobulinas
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosídeo (do inglês, <i>Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside</i> )
kDa	Kilo Dalton
keV	Kilo-eletrão volt
L	Litro

<b>L</b>	Percurso ótico
<b>LB</b>	Luria-Bertani
<b>LDH</b>	Lactato desidrogenase
<b>Leu</b>	Leucina
<b>LSPR</b>	Ressonância plasmónica de superfície localizada (do inglês, <i>Localized surface plasmon resonance</i> )
<b>M</b>	Molar
<b>MAA</b>	Ácido mercaptacético (do inglês, <i>Acid mercaptoacetic</i> )
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>MM</b>	Massa molecular
<b>Mm</b>	Mililitro
<b>MPA</b>	Ácido mercaptopropionico (do inglês, <i>Acid mercaptopropionic</i> )
<b>MUA</b>	Ácido mercaptoundecanóico (do inglês, <i>Mercaptoundecanoic acid</i> )
<b>NaCl</b>	Cloreto de sódio (do inglês, <i>Sodium Chloride</i> )
<b>NaOH</b>	Hidróxido de sódio
<b>NHS</b>	N-hidroxisuccinimida (do inglês, <i>N-Hydroxysuccinimide</i> )
<b>Ni-NTA</b>	Níquel agarose ácido nitriloacético (do inglês, <i>Níquel-Nitrilotriacetic acid agarose</i> )
<b>Nm</b>	Nanómetro
<b>nM</b>	Nanomolar
<b>NP</b>	Nanopartícula
<b>OMS</b>	Organização mundial de saúde
<b>P</b>	<i>Plasmodium</i>
<b>PBS</b>	Tampão fosfato-salino (do inglês, <i>Phosphate buffered saline</i> )
<b>PCR</b>	Reação em cadeia de polimerase (do inglês, <i>Polymerase chain reaction</i> )
<b>PfHRP2</b>	Proteína rica em histidina 2 produzida pelo <i>P. falciparum</i>
<b>pKa</b>	- logaritmo (Ka)
<b>pLDH</b>	Lactato desidrogenase do <i>Plasmodium</i> (do inglês, <i>Plasmodium lactate dehydrogenase</i> )
<b>POC</b>	Poin of Care
<b>QBC</b>	<i>Quantitative buffy coat</i>
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sódio (do inglês, <i>Sodium dodecyl sulfate</i> )
<b>SDS-PAGE</b>	Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (do inglês, <i>Sodium dodecyl sulfate – polyacrilamide gel electrophoresis</i> )
<b>SEM</b>	Microscopia eletrónica de varrimento (do inglês, <i>Scanning electron microscopy</i> )
<b>T</b>	Transmitância
<b>TDR</b>	Teste de diagnóstico rápido
<b>TEMED</b>	N,N,N',N-Tetrametiletilenodiamina
<b>UV-Visível</b>	Espetroscopia de ultravioleta-visível
<b>V</b>	Volt
<b>E</b>	Coefficiente de extinção molar

## 1 Enquadramento e objetivos

Em 2013 a Organização Mundial de Saúde (OMS) registou aproximadamente 198 milhões de casos de malária, que resultaram em cerca de 584 mil mortes, a maioria registados nos países em vias de desenvolvimento.

A malária é transmitida através da picada de um mosquito fêmea *Anopheles* infetado com o parasita do género *Plasmodium* (*P.*). Das espécies *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* e *P. malariae*, a espécie *P. falciparum* é considerada a mais mortal.

A microscopia ótica ainda é nos dias de hoje considerado como o método *gold standard* no diagnóstico desta doença, no entanto este método não está ao alcance dos países em vias de desenvolvimento, uma vez que, para a sua execução são necessários equipamentos de elevado custo, infraestruturas com as condições necessárias, bem como profissionais especializados e reagentes apropriados.

Assim sendo, o desenvolvimento de testes de diagnóstico rápido (TDR), que poderão ser utilizados por estes países, são uma alternativa benéfica, na medida em que são rápidos de executar, de baixo custo, permitem obter com resultados em poucos minutos, são fáceis de manusear e interpretar e não necessitam de muitas infraestruturas.

O principal objetivo da presente dissertação centra-se no desenvolvimento de um TDR para a detecção de malária em amostras clínicas num formato competitivo, baseado em nanopartículas de ouro (AuNP) funcionalizadas com o ácido mercaptoundecanoico (MUA) ou com o pentapéptido Cys-Ala-Leu-Asn-Asn (CALNN) e subsequentemente conjugadas com um anticorpo monoclonal anti-*Pf*HRP2 que reconhece especificamente a proteína rica em histidina 2 produzida por *P. falciparum* (*Pf*HRP2).

As nanopartículas de ouro possuem uma elevada solubilidade em água, estabilidade, exibem excelentes propriedades óticas, na medida em que a sua ressonância ótica é na gama do visível e é possível funcionalizar a sua superfície com diversas moléculas biológicas. Todas estas características tornam as nanopartículas de ouro atrativas para detecção em biossensores [1], [2].

No desenvolvimento do TDR será utilizada uma tecnologia inovadora, designada por tecnologia *lab on paper*. Recorre ao papel de cromatografia *Whatman* nº1, um substrato pouco dispendioso, biodegradável que pode ser facilmente impresso, revestido e impregnado.

Este projeto contempla várias etapas:

Síntese, caracterização e funcionalização de AuNP de 17 nm e 52 nm com MUA ou CALNN e subsequente conjugação com o anticorpo monoclonal anti-*Pf*HRP2;

Estudos de estabilidade de soluções de AuNP, AuNP-MUA, AuNP-CALNN e AuNP-MUA- anti-*Pf*HRP2 por variação de pH e força iónica do meio, recorrendo à espectroscopia de UV-Visível;

Desenvolvimento de um teste de diagnóstico rápido para a detecção de malária em amostras clínicas

Produção e purificação do antígeno recombinante *PfHRP2*, sobreexpresso em *E. coli*;

Projeção do TDR utilizando o *software* informático *adobe illustrator*;

Desenvolvimento do TDR; otimização de todos os componentes do teste para a aplicação de culturas de sangue *in vitro* infetadas e não infetadas.

## 2 Introdução

### 2.1 A Malária

A malária é provocada pela infecção de quatro possíveis espécies de parasitas protozoários do género *Plasmodium*, (*P.*), estes são, *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* e *P. malariae*. Existe também uma quinta espécie, *P. knowlesi* cujo hospedeiro mais comum para este parasita é a *Macaca fascicularis* (macaco), no entanto recentemente foi descoberto que este pode também infectar o Homem. A malária tem como modo de transmissão uma picada do mosquito fêmea *Anopheles*, apresentado na Figura 2.1 [3], [4].



**Figura 2.1** – Mosquito fêmea *Anopheles*. Retirado de <http://scientistsagainstmalaria.net/vector/anopheles-vector>, consultado a 15.05.2015.

A malária continua a ser uma das doenças mais perigosas dos tempos modernos, tendo sido registados em 2013, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), uma estimativa de 198 milhões de casos de pessoas infetadas com malária em todo o mundo, resultando desses casos 584 mil mortes. A espécie *P. falciparum* é de todas a que apresenta maior taxa de mortalidade [5].

A transmissão da doença ocorre em grandes áreas de África, América Central e Sul, bem como em algumas zonas das Caraíbas e Ásia, incluindo o Sul e Sudeste do continente Asiático e o Oriente Medio, Europa Oriental e Pacífico Sul, como se pode observar pela Figura 2.2 [6].



**Figura 2.2** – Mapa-mundo evidenciando áreas de malária endémica a vermelho. Retirado de <http://www.mercycorps.org/articles/thoughts-world-malaria-day>, consultado a 7.08.2015.

## 2.2 Ciclo de vida do parasita

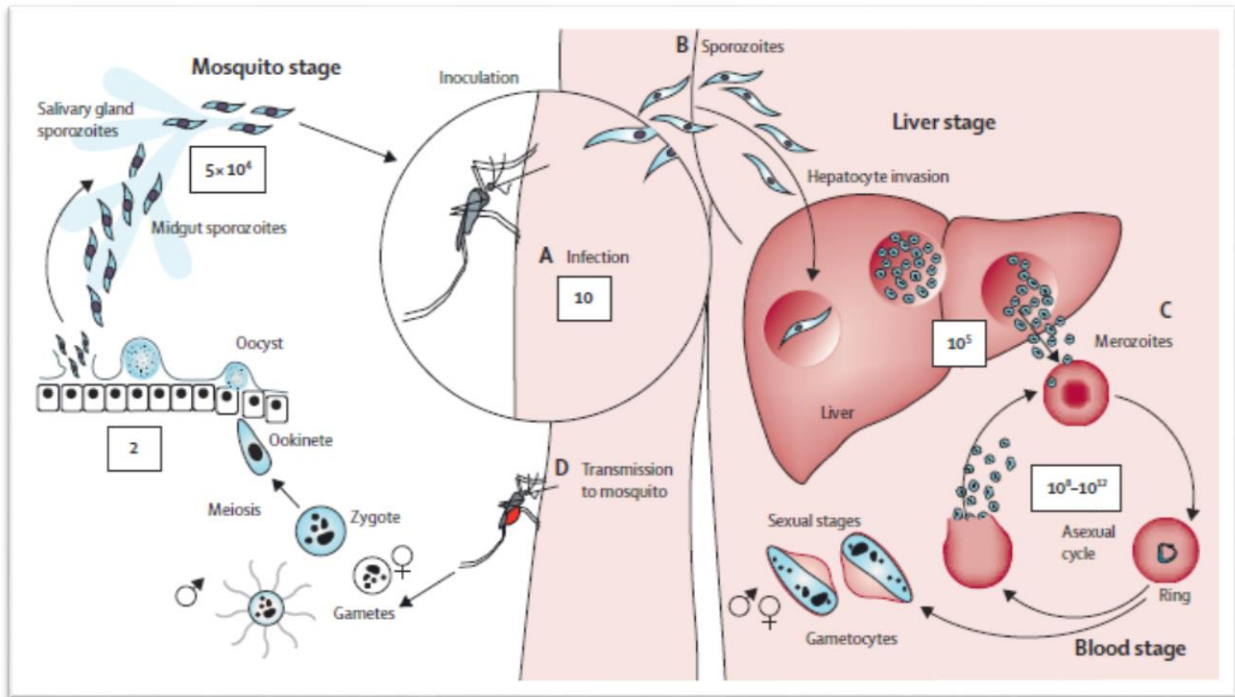
O ciclo de vida do parasita pode durar aproximadamente um mês e inicia-se com a transmissão de esporozoítos móveis para a circulação sanguínea do hospedeiro durante a alimentação do mosquito, viajando estes posteriormente para o fígado, onde cada esporozoíto invade um hepatócito, diferenciando-se e multiplicando-se, dando origem entre 10 000 e 30 000 merozoítos filhos. Quando ocorre o colapso dos esquizontes hepáticos, são libertados merozoítos que irão invadir os eritrócitos e dar início à fase assexuada. A fase assexuada tem a duração de aproximadamente 48 horas para o *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. ovale*, no caso do *P. malariae* demora cerca de 72 horas e para o *P. knowlesi* apenas 24 horas.

O parasita intraeritrocitário em crescimento consome o conteúdo dos glóbulos vermelhos, modifica a membrana celular e pode durar aproximadamente um mês e inicia-se com a transmissão de esporozoítos móveis para a circulação sanguínea do hospedeiro na alimentação do mosquito. Os esporozoítos viajam até fígado, onde cada um invade um hepatócito, diferenciando-se e multiplicando-se, podendo dar origem entre modo a facilitar-lhe a importação de nutrientes e elimina hemos potencialmente tóxicos através de cristalização mediada por lípidos convertendo-os em hemozoína biologicamente inerte.

Seis a oito dias após a sua saída do fígado, quando a densidade parasitária atingiu os 50  $\mu\text{L}$  de sangue (aproximadamente 100 milhões de parasitas no sangue de um adulto), é possível a sua detecção por microscopia ou através de TDR e dá-se início à fase assintomática da infeção. O período de incubação é normalmente entre 12 a 14 dias a partir do momento em que o hospedeiro é picado pelo mosquito.

No final do ciclo de vida intraeritrocitário, o parasita já consumiu a maior parte do conteúdo dos glóbulos vermelhos e ocorreram varias divisões nucleares. O esquizonte eritrocitário colapsa e liberta entre 6 a 30 merozoítos filhos e cada um destes merozoítos pode invadir os eritrócitos e repetir novamente o ciclo [4].

Alguns parasitas da fase sanguínea desenvolvem-se em formas sexuadas, os gametocítos e quando um mosquito volta a alimentar-se de um humano os gametocítos vão ser transmitidos para o mosquito, reproduzem-se, formando um oocineto e em seguida um oocisto no intestino do mosquito. O oocisto explode e liberta esporozoítos, que vão migrar para as glândulas salivares do mosquito, aguardando a inoculação na próxima alimentação de sangue do mesmo. Todas as multiplicações e diferenciações do parasita no humano ocorrem por mitose, enquanto no mosquito apenas ocorrem meioses. Os sintomas variam de acordo com a gravidade e o doente pode apresentar dores de cabeça, hipoglicemia, anemia, febre, falha renal e malária cerebral levando à morte [4], [7]. O ciclo de vida do parasita encontra-se representado na Figura 2.3.

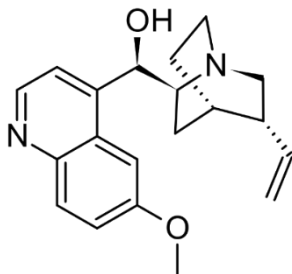


**Figura 2.3** - Ciclo de vida do parasita da malária, no hospedeiro e no mosquito. Nas caixas de fundo branco encontram-se o número estimado de parasitas existentes em cada fase do ciclo do parasita. Retirado de [2].

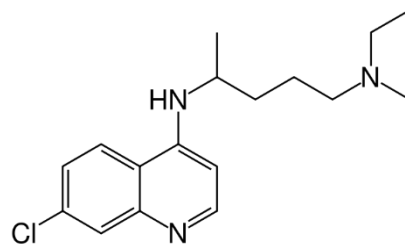
## 2.3 Fármacos anti maláricos

Vários fármacos anti maláricos foram utilizados no tratamento da malária ao longo do tempo, todavia, o parasita ou o organismo hospedeiro desenvolveu resistência a todos eles.

O primeiro fármaco anti malárico descoberto foi a quinina (Figura 2.4), cujo seu modo de ação consistia na eliminação do parasita na fase em que este se encontrava dentro dos glóbulos vermelhos. A primaquina, a cloroquina (Figura 2.5), entre outros fármacos anti maláricos foram também utilizados para o tratamento [3], [4]. Estes fármacos hoje em dia já não são administrados individualmente devido à resistência criada pelo parasita.



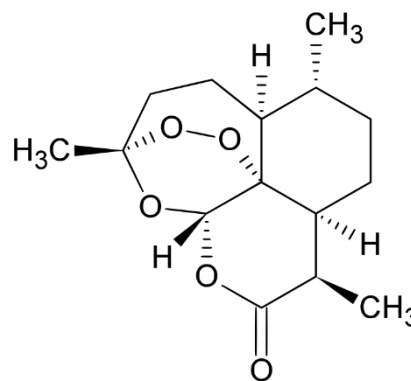
**Figura 2.4** – Estrutura do fármaco quinina



**Figura 2.5** – Estrutura do fármaco cloroquina.

Desenvolvimento de um teste de diagnóstico rápido para a detecção de malária em amostras clínicas

Surgiu então a artemisinina (Figura 2.6) e seus derivados, isolada da planta chinesa *Artemisia annua*. A artemisinina e seus derivados demonstraram ser eficazes no tratamento da malária, uma vez que, têm a capacidade de reduzir rapidamente o número de parasitas do gênero *Plasmodium* em doentes infetados. As terapias combinadas baseadas na artemisinina (ACTs) são, nos dias de hoje, as recomendadas pela OMS como o tratamento de primeira linha de malária não complicada provocada pelo *P. falciparum*. A expansão ao acesso de ACTs nos países endêmicos de malária tem sido fundamental para o recente sucesso da redução global da doença. O papel da artemisinina é reduzir a quantidade dos principais parasitas durante os três primeiros dias de tratamento, por outro lado, o papel do fármaco parceiro é a eliminação dos restantes parasitas [8].



**Figure 2.6** – Estrutura do fármaco artemisinina.

## 2.4 Métodos de diagnóstico

É fundamental o diagnóstico rápido, precoce e preciso da doença para uma gestão eficaz da mesma. O diagnóstico de malária envolve a identificação dos parasitas ou de antígenos no sangue do paciente. Embora pareça ser uma pesquisa simples, a eficácia do diagnóstico depende de diversos fatores, tais como, a existência de cinco diferentes parasitas, as diferentes fases de esquizogonia nos eritrócitos, o carácter endêmico das diferentes espécies, a inter-relação entre os níveis de transmissão, o movimento populacional, a resistência aos fármacos, o uso de quimioprofilaxia (uso de fármacos anti maláricos em doses subterapêuticas, a fim de reduzir formas clínicas graves e a possibilidade de morte devido à infecção pelo *P.falciparum*) ou mesmo o tratamento preventivo com base no diagnóstico podem influenciar a interpretação do diagnóstico [9].

A detecção precoce dos eventuais casos de malária pode ser feita tanto através de diagnóstico laboratorial em centros de saúde e hospitais, como por diagnóstico clínico ou por testes de diagnóstico rápido em instalações de saúde periféricas onde a microscopia não está acessível.

A nível do diagnóstico e tratamento da doença existem dois grandes problemas, nos países desenvolvidos, onde a malária já não é endêmica, os profissionais de saúde já não estão familiarizados com a doença e ao se depararem com um doente infetado podem não considerar a doença entre os potenciais diagnósticos. Os técnicos podem também ter falta de experiência ou falta de familiarização no que toca à doença e não detetarem o parasita ao examinarem as amostras de sangue ao microscópio. Nos países em vias de desenvolvimento a maioria dos casos de febre/sintomas de infecção viral são tratados presumindo que se trata de malária sem confirmação laboratorial da mesma. Esta prática pode

Desenvolvimento de um teste de diagnóstico rápido para a deteção de malária em amostras clínicas

então resultar num uso excessivo de fármacos anti maláricos e atrasos no diagnóstico de outras patologias com sintomas semelhantes [9], [10].

Existem vários métodos para o diagnóstico de malária, o diagnóstico clínico, laboratorial e molecular.

#### **2.4.1 Diagnóstico clínico**

O diagnóstico clínico é baseado nos sintomas e sinais demonstrados pelo doente e resultados físicos após realização de exames médicos. Os primeiros sintomas são febre, calafrios, dores de cabeça e musculares, fraqueza, náuseas, vómitos, entre outros. Estes sintomas não são específicos da doença e são variáveis de doente para doente.

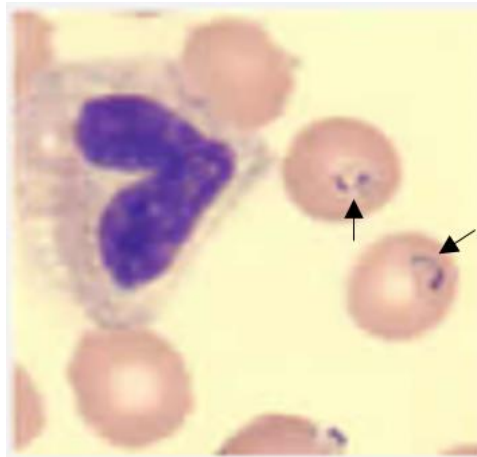
Nos casos mais graves os sintomas são mais evidentes, podendo estes ser, o coma, confusão, sinais focais neurológicos, anemia grave, dificuldades respiratórias, hipoglicemia, falha renal, hiperbilirrubinemia, distúrbios no equilíbrio ácido-base e com estes sintomas o médico poderá realmente suspeitar de malária. Se possível, o diagnóstico clínico deverá ser confirmado com diagnóstico microscópico, testes de diagnóstico rápido, entre outros [9], [11].

#### **2.4.2 Diagnóstico laboratorial**

O diagnóstico laboratorial envolve uma série de técnicas, tais como diagnóstico por microscopia ótica, os testes serológicos, a técnica *quantitative buffy coat* (QBC), entre outros.

O diagnóstico por microscopia ótica é ainda, hoje em dia, a técnica *gold standard* para o diagnóstico de malária. Utiliza esfregaços de sangue, que podem ser corados com diferentes corantes, Giemsa, Wright ou Field. Esta técnica utiliza filmes de sangue finos corados com o corante Giemsa para rastrear a presença ou ausência do parasita e filmes de sangue espessos para a confirmação da espécie. A Figura 2.7 ilustra uma amostra de sangue de um doente infetado com o parasita da malária.

Os processos de coloração e interpretação são trabalhosos, morosos e requerem profissionais de saúde com experiência considerável, particularmente na identificação de espécies com precisão a baixos níveis de parasitemia ou em casos de infeção por mais do que uma espécie. A lacuna mais crítica no diagnóstico por microscopia ótica é a baixa sensibilidade, principalmente na presença de níveis baixos de parasitemia. Um bom profissional pode detetar até 5 parasitas por microlitro, enquanto que um profissional médio deteta entre 50 a 100 parasitas por microlitro [12], [13], [9].



**Figura 2.5** – Amostra de sangue com a coloração de Giemsa. As setas a preto indicam dois glóbulos vermelhos que contém o parasita da malária. Retirado de [http://www.cdc.gov/malaria/diagnosis\\_treatment/diagnosis.html](http://www.cdc.gov/malaria/diagnosis_treatment/diagnosis.html), consultado a 11.05.2015.

A técnica QBC foi pensada para aumentar a detecção de parasitas e simplificar o diagnóstico na microscopia ótica. Consiste na coloração do DNA do parasita em tubos micro hematócritos com corantes fluorescentes, por exemplo, o laranja de acridina e a sua subsequente detecção por microscopia epi-fluorescente [9].

O diagnóstico serológico baseia-se na detecção de anticorpos contra parasitas da doença na fase sanguínea assexuada, utilizando técnicas como a imunofluorescência indireta (IFA) ou *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA). Se no soro do doente se verificar a existência do antígeno da malária este vai-se ligar ao anticorpo e formar o complexo anticorpo-antígeno [9], [11].

### 2.4.3 Diagnóstico molecular

O diagnóstico molecular providencia uma maior sensibilidade e especificidade quando comparado com outros métodos referidos anteriormente. O diagnóstico molecular engloba técnicas como a reação em cadeia da polimerase (PCR), espectrometria de massa, citometria de fluxo, entre outros.

A PCR apresenta uma elevada especificidade e sensibilidade, particularmente quando se trata de casos com baixo nível de parasitemia ou infeções mistas. Por esta técnica é possível a detecção de 1 a 5 parasitas por microlitro de sangue, enquanto por microscopia ótica ou testes de diagnóstico rápido a detecção varia entre 50 a 100 parasitas por microlitro de sangue.

Contudo esta técnica necessita de profissionais especializados, infraestruturas e equipamentos especializados e é uma técnica bastante dispendiosa, como tal, não é utilizada rotineiramente por países em vias de desenvolvimento, devido à falta de recursos e à complexidade da mesma [9], [11].

#### 2.4.4 Diagnóstico por testes de diagnóstico rápido

A OMS estabeleceu determinadas diretrizes para o desenvolvimento de testes de diagnóstico adequados para aplicações *point-of-care* transportadas para o acrónimo ASSURED, *affordable, sensitive, specific, user-friendly, rapid e robust, equipment-free e delivered to those in need*. Basicamente estes testes têm que ser de fácil acesso, com elevada sensibilidade, específicos e a sua utilização e compreensão acessível, rápidos e robustos, livres de equipamentos e entregues a quem deles necessita.

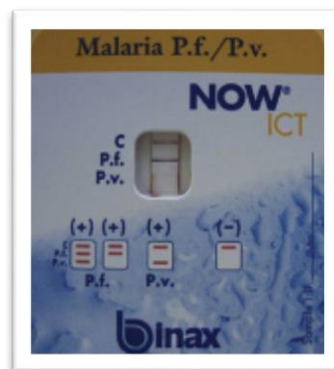
Os TDR que estão disponíveis comercialmente possuem todos o mesmo princípio, a detecção de um antigénio presente no sangue que vai migrar ao longo de uma membrana que contém anticorpos específicos para o antigénio. Estes testes fornecem resultados entre 2 a 15 minutos e são uma alternativa à microscopia ótica, quando esta não está ao alcance de determinados países.

A maioria dos testes de diagnóstico rápido têm como alvo a proteína específica produzida pelo *P. falciparum*, a proteína rica em histidina 2 (HRP2) ou a lactato desidrogenase (LDH).

Os TDR são utilizados atualmente em programas clínicos, no entanto a sua precisão necessita de ser melhorada, reduzindo o seu custo e garantindo que o seu desempenho é fidedigno mesmo em condições adversas. Apesar desta prática ser desencorajada, muitos serviços de saúde guardam a amostra de sangue para confirmação do resultado por microscopia ótica até que existam técnicos qualificados para tal, ou enviam a amostra para laboratórios comerciais ou de referência.

O uso de TDR não elimina a necessidade de verificar por microscopia se o doente está ou não infetado com o parasita. Estes podem não conseguir detetar algumas infeções que contenham um baixo número de parasitas em circulação na corrente sanguínea do doente. Assim sendo, todos os resultados negativos devem ser confirmados por microscopia [9], [11].

De acordo com a OMS os TDR devem ter uma sensibilidade mínima de 95%, 100% quando a densidade de parasitas é acima de 100/μL e especificidade mínima de 90% Na Figura 2.8 encontra-se um TDR com um resultado positivo para *P. falciparum* [14].



**Figura 2.8** – TDR para o diagnóstico de malária. O teste revela um resultado positivo para infeção por *P. falciparum*. Retirado de [http://www.cdc.gov/malaria/diagnosis\\_treatment/rdt.html](http://www.cdc.gov/malaria/diagnosis_treatment/rdt.html), consultado a 5.04.2015.

## 2.5 Proteína rica em histidina 2

A proteína rica em histidina 2 (HRP2) é uma proteína rica em histidinas e alaninas que se encontra em diversos compartimentos celulares, incluindo o citoplasma do *P. falciparum* e gametócitos [15], [16]. O gene que codifica para a HRP2 é uma cópia única de um gene subtelomérico localizado no cromossoma 7 que codifica para uma sequência de 277 aminoácidos com a seguinte composição, 34% histidina, 37% alanina e 10% ácido aspártico.

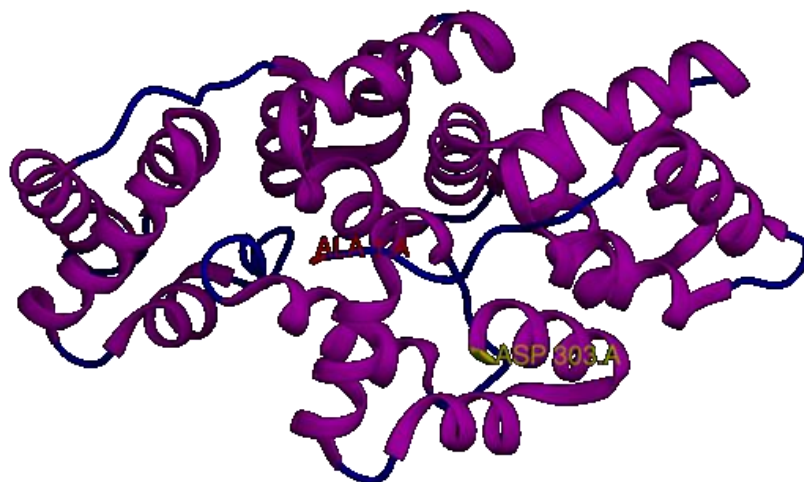
Esta proteína é caracterizada por possuir múltiplas repetições da sequência contígua AHH e AHHAAD. Tem entre 60 a 105 kDa, é solúvel em água e específica do *P. falciparum*, sintetizada e presente durante toda a fase assexuada do parasita da malária e identificada como sendo uma proteína com superfície exposta em eritrócitos infetados. É também encontrada em circulação no sangue periférico de indivíduos infetados, tornando-se então um ótimo alvo para o diagnóstico de uma infecção por *P. falciparum* [17].

É uma proteína apenas produzida pelo *P. falciparum* e por mais nenhuma espécie de *Plasmodium* que infete os humanos. Na fase final do ciclo, ao dar-se a ruptura dos eritrócitos infetados a HRP2 é libertada para o plasma sanguíneo e circula em concentrações elevadas, na gama dos nano e micromolares. É relativamente estável no plasma, onde permanece detetável durante vários dias ou semanas depois do tratamento [16].

A sua função ainda não é clara, mas pensa-se que está envolvida na destoxificação de grupos Hemo livres convertendo-os em hemozoína inactiva, na ligação ao Hemo, supressão da resposta imunitária e ligação ao zinco<sup>2+</sup>. Atualmente a principal aplicação do conhecimento detalhado da HRP2 é a sua utilização para o diagnóstico de malária através da sua detecção em ensaios imunocromatográficos, levando assim ao desenvolvimento de uma serie de TDR para a malária, proporcionando uma alternativa ao diagnóstico microscópico [15], [16].

A quantidade de HRP2 encontrada em amostras de cultura está fortemente relacionada com o crescimento do parasita e aumenta com o desenvolvimento e multiplicação do mesmo. Esta proteína pode então funcionar como um bom indicador do crescimento do parasita e da sua inibição através de fármacos anti maláricos [15].

A HRP2 pode ser detetada em eritrócitos, no soro, no plasma, no fluido cérebroespinal e até em urina de pessoas infetadas [16]. Apesar da HRP2 apenas ser expressa pelo *P. falciparum* e consequentemente os TDR baseados na detecção deste antígeno apenas diagnosticarem esta espécie, não é considerada uma limitação, uma vez que, em África 95% dos casos de malária são causados por esta espécie. [18]. Muitos estudos demonstraram que a sensibilidade de testes baseados na HRP2 diminui acentuadamente quando a densidade parasitária desce abaixo de 100 para 500 parasitas por microlitro [14]. Na Figura 2.9 encontra-se um modelo teórico 3D da proteína HRP2.



**Figura 2.9** – Modelo teórico da estrutura 3D da proteína HRP2. A magenta estão assinaladas as hélices- $\alpha$ , a azul os coils, a vermelho está assinalado o N-terminal, uma alanina e a amarelo o C-terminal, um aspartato. Código PBD:1L8M

### 2.5.1 Outros antígenos do género *Plasmodium*

Existem mais dois antígenos expressos pelas espécies do género *Plasmodium*, a lactato desidrogenase (pLDH) e a aldose. Ambos os antígenos são utilizados em TDR para o diagnóstico de malária. Na Tabela 2.1 são apresentadas as principais características dos antígenos pLDH e aldolase.

**Tabela 2. 1** - Características dos antígenos pLDH e aldolase.

Antígeno	Características
<p><b>pLDH</b> [19], [20], [13]</p>	Enzima glicolítica e solúvel
	Expressa em níveis elevados na fase assexuada do parasita
	Permite a diferenciação muito rapidamente (10 minutos)
	Encontra-se nas 4 espécies de <i>Plasmodium</i>
	Desaparece dentro de 24 horas após tratamento
<p><b>Aldolase</b> [21], [22]</p>	Principal enzima envolvida no ciclo glicolítico do <i>Plasmodium</i>
	Libertada para o sangue durante a infeção
	Pode ser encontrada no citoplasma do parasita em formas solúveis

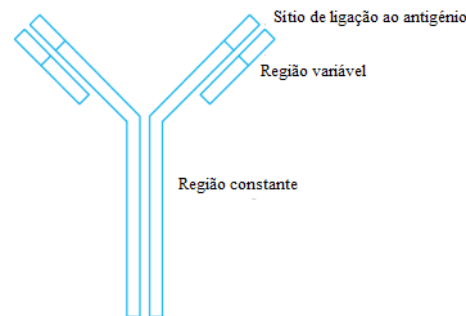
## 2.6 Anticorpos

Anticorpos são glicoproteínas secretadas por linfócitos B especializados, conhecidos como as células do plasma. Também são denominados por imunoglobulinas (Ig<sup>1</sup>) e dependendo da classe de

Desenvolvimento de um teste de diagnóstico rápido para a detecção de malária em amostras clínicas

Ig, podem ser combinadas até 5 moléculas para formar um anticorpo. Em mamíferos existem 5 classes de Ig, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE. A classe determina o tipo e a natureza temporal da resposta imune.

A estrutura de um anticorpo tem a forma de um Y e é composto por duas cadeias, pesadas e leves (Figura 2.10). Cada uma destas cadeias contém múltiplas regiões constantes e variáveis ligadas por pontes dissulfureto. O N-terminal das cadeias leves e das cadeias pesadas associa-se para formar um domínio de ligação ao antígeno e as regiões do C-terminal das duas cadeias pesadas dobram-se para formar o domínio Fc (domínios efetores). As cadeias leves são constituídas por uma porção variável N-terminal de 110 aminoácidos e uma região constante com um comprimento semelhante. Do mesmo modo, as cadeias pesadas são também divididas em regiões variáveis e constantes, contudo a cadeia leve tem uma região variável e pelo menos três regiões constantes, cada uma com aproximadamente 110 aminoácidos.



**Figura 2.10** – Estrutura de um anticorpo. Adaptado de <https://www.pacificimmunology.com/resources/antibody-introduction/what-is-an-antibody/>, consultado a 5.06.2015.

Os anticorpos têm duas funções essenciais. Ligam-se aos epítomos de um antígeno pelos braços do Y. Cada braço ou domínio do fragmento Fab do anticorpo monovalente contém um local de ligação, tornando cada anticorpo uma molécula bivalente. A outra função está relacionada com o domínio Fc do Y que faz parte do anticorpo e que possui funções efetoras biológicas como por exemplo a fagocitose ou o combate às células cancerígenas.

A interação com antígenos é fulcral para o anticorpo exercer a sua função biológica natural. A especificidade da resposta do anticorpo é mediada pelas células T ou B através de recetores associados à membrana que ligam os antígenos de uma única especialidade. Após a ligação de um antígeno e a receção de outros sinais de ativação os linfócitos B dividem-se, produzindo células de memória B. Os linfócitos de memória B permanecem dormentes até serem posteriormente ativados pelo antígeno específico. Como a maioria dos antígenos são altamente complexos, apresentam inúmeros epítomos que são reconhecidos por um grande número de linfócitos. Cada linfócito é ativado para proliferar e diferenciar-se em células do plasma, e a resposta resultante do anticorpo é policlonal, ou seja,

Desenvolvimento de um teste de diagnóstico rápido para a deteção de malária em amostras clínicas

reconhece múltiplos epítomos no mesmo antígeno. Em contraste, os anticorpos monoclonais são anticorpos produzidos por um único linfócito B, então só se ligam a um único epítomo. Cada anticorpo individual numa mistura policlonal é tecnicamente um anticorpo monoclonal, contudo, este termo geralmente refere-se a um processo pela qual a célula B é isolada e fundida a uma linha celular imortal – hibridoma, para gerar grandes quantidades de anticorpos idênticos. A especificidade de um anticorpo refere-se à sua capacidade de reconhecer um epítomo específico mesmo na presença de vários epítomos [23], [24], [25].

O anticorpo que será utilizado neste projeto será um anticorpo monoclonal anti-*PfHRP2*, ou seja, só reconhece um único epítomo no antígeno HRP2 da espécie *P. falciparum*.

Na Tabela 2.2 e 2.3 encontram-se as principais vantagens e desvantagens de anticorpos mono e policlonais.

**Tabela 2. 2** - Vantagens e desvantagens de anticorpos monoclonais [18].

#### **Anticorpo monoclonal**

<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
Capacidade de produzir grandes quantidades de anticorpos idênticos.	A sua produção é mais dispendiosa e requer mais tempo.
Apresenta elevada especificidade para um único epítomo, probabilidade reduzida de reatividade cruzada.	Menos robusto na deteção de proteínas desnaturadas ou com conformação alterada.
Melhores resultados em ensaios de quantificação de níveis de proteínas.	Alterações no epítomo tornam o anticorpo incapaz de detetar a proteína alvo.

**Tabela 2. 3** - Vantagens e desvantagens de anticorpos policlonais [18].

#### **Anticorpo policlonal**

<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
Produção pouco dispendiosa e rápida	Variabilidade entre os diferentes <i>batches</i> produzidos em diferentes animais a tempos diferentes.
Elevada sensibilidade na deteção de proteínas que estão presentes em baixas quantidades.	Purificação por afinidade do soro para minimizar a reatividade cruzada
Maior afinidade contra o antígeno devido ao reconhecimento de múltiplos epítomos.	Maior probabilidade de reatividade cruzada devido ao reconhecimento de vários epítomos.

## 2.7 Testes imunocromatográficos de fluxo lateral

Os testes imunocromatográficos de fluxo lateral usualmente são constituídos por uma linha de teste e uma linha de controlo onde são previamente imobilizados os reagentes. Para futura utilização aplicar-se-á numa zona própria a amostra (sangue, saliva, entre outros) e essa amostra irá migrar ao longo do teste e ao fim de poucos minutos irá surgir uma resposta, nas linhas de teste e de controlo, geralmente colorimétrica.

Nos TDR podem ser utilizadas nanopartículas de ouro, carbono, selénio ou prata, partículas magnéticas, *quantum dots*, fluoróforos orgânicos, corantes têxteis, enzimas, lipossomas, entre outros.

Qualquer material a ser utilizado como marcador deve ser detetável a baixas concentrações e deve manter as suas propriedades mesmo após conjugação. A fácil conjugação com biomoléculas e a estabilidade durante um longo período de tempo são características desejáveis para um bom marcador. Este pode estar a concentrações na ordem dos nano molares que continua a ser opticamente detetável. Após o ensaio alguns marcadores geram um sinal direto e visível a olho nu (por exemplo, uma solução coloidal de ouro) enquanto outros requerem passos adicionais para produzirem um sinal (por exemplo, as enzimas produzem um produto detetável após terem reagido com o substrato).

Os testes de diagnóstico rápido são aplicados em diversas áreas, destacam-se as análises clínicas, onde o rastreio de determinadas patologias pode ser feito utilizando uma variedade muito abrangente de amostras, por exemplo, plasma, soro, urina, células e tecidos; detecção de agentes patogénicos e toxinas transmitidos pelos alimentos; a detecção de poluentes tóxicos e metais pesados.

Existem vários formatos em que estes testes podem ser concebidos, o formato *sandwich*, competitivo e múltipla detecção [26]. O TDR desenvolvido na presente dissertação baseia-se num formato competitivo. A Tabela 2.4 apresenta algumas vantagens e desvantagens quanto ao uso dos testes de diagnóstico rápido.

**Tabela 2. 4** - Vantagens e desvantagens da utilização de testes imunocromatográficos de fluxo [19].

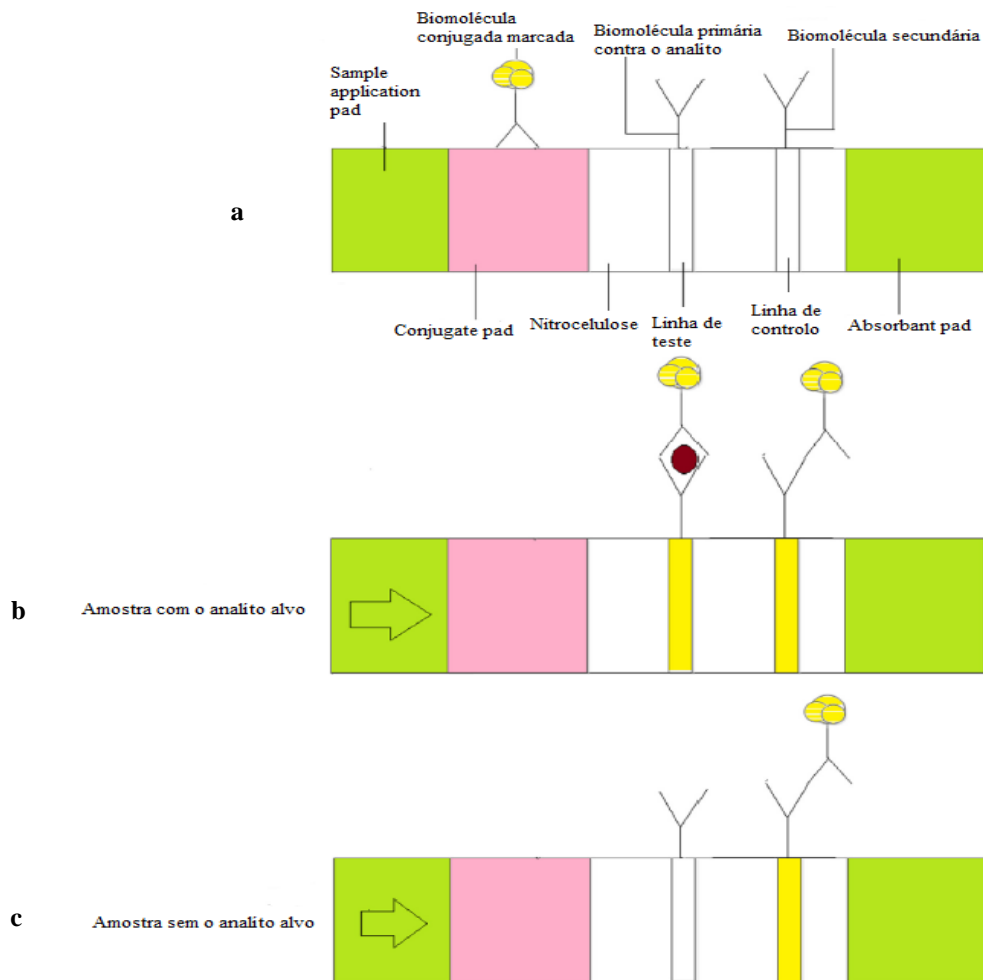
<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
Baixo custo	Principalmente qualitativo ou semi-quantitativo
Estável sob as mais variadas condições ambientais	Reprodutibilidade varia de lote para lote
Tempo de vida longo	A maioria dos aparelhos pode detetar mais do que um ou dois analitos simultaneamente
Fácil utilização	Por vezes é necessário o pré-tratamento da amostra
Pouca quantidade de amostra	Assim que a amostra é aplicada a ação dos capilares não pode ser diminuída ou aumentada
Aplicação da amostra geralmente sem pré-tratamento	Tempo de análise dependente de fatores como, viscosidade e tensão de superfície
Elevado potencial de comercialização	
Pouco ou nenhum consumo de energia	

### 2.7.1 Formato sandwich

No formato *sandwich* um anticorpo revestido por um marcador (enzimas, nanopartículas, corantes fluorescentes) é imobilizado numa plataforma de conjugação. Na linha de teste é imobilizado um anticorpo primário contra o analito alvo. Na linha de controlo é imobilizado um anticorpo secundário ou uma sonda contra um anticorpo marcado.

A amostra que contém o analito é aplicada na plataforma de aplicação da amostra, migrando ao longo do teste. Na plataforma de conjugação, o analito alvo é capturado pelo anticorpo imobilizado, resultando na formação do complexo anticorpo-analito, alcançando a membrana de nitrocelulose por capilaridade.

Na linha de teste o complexo anticorpo-analito é capturado por outro anticorpo que é primário para o analito. O analito fica “ensandwichado” formando o complexo anticorpo marcado-analito-anticorpo primário. A intensidade da cor da linha de teste corresponde à quantidade do analito alvo e é avaliada visualmente ou com indicador. O aparecimento de cor na linha de controlo indica que esta está a funcionar corretamente. Em alguns testes em formato de sandwich a linha de controlo não é incluída. Na Figura 2.11 encontra-se representado um teste em *sandwich* [26].



**Figura 2.11** – Esquema de um teste imunocromatográfico em formato sandwich (a). Num resultado positivo a amostra que contém o analito alvo é aplicada na plataforma de aplicação da amostra e migra ao longo do teste, resultando no aparecimento de cor na linha de teste e de controlo (b). Num resultado negativo, a amostra não contém o analito alvo e ao ser aplicada na plataforma de aplicação da amostra, migra ao longo do teste, resultando no aparecimento de cor apenas na linha de teste (c). Adaptado de [26].

### 2.7.2 Formato competitivo

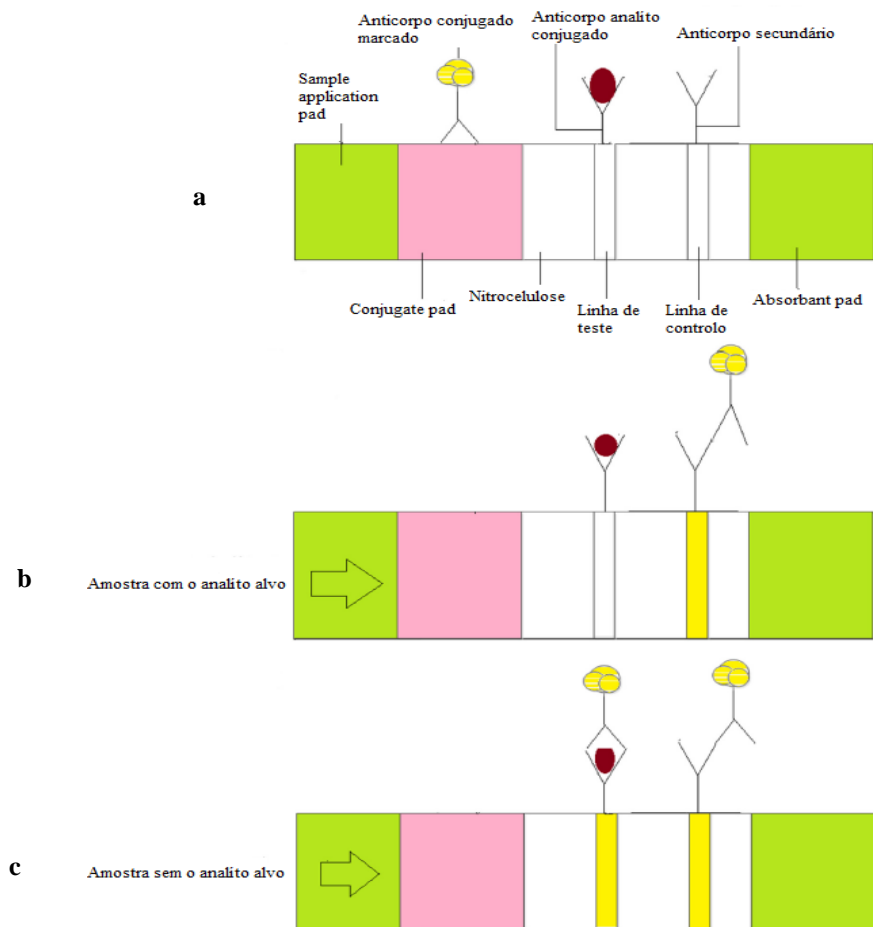
O formato competitivo (Figura 2.12) é adequado para compostos de baixo peso molecular, que não têm a capacidade de se ligarem a dois anticorpos em simultâneo. A ausência de cor na linha teste é indicadora da presença do analito, enquanto a presença de cor na linha de controlo e na linha de teste indica um resultado negativo.

O formato competitivo tem dois formatos. No primeiro a solução que contém o analito alvo é aplicada sobre a plataforma de aplicação da amostra, essa plataforma contém um anticorpo previamente imobilizado, ocorrendo migração. A linha de teste contém o antígeno pré-imobilizado (o mesmo analito a ser detetado) que se vai ligar especificamente ao anticorpo. A linha de controlo contém o anticorpo secundário que foi pré-imobilizado, e que tem a capacidade de se ligar ao

Desenvolvimento de um teste de diagnóstico rápido para a deteção de malária em amostras clínicas

anticorpo. Quando a amostra migra até à linha de teste, o antígeno pré-imobilizado na mesma, vai-se ligar ao conjugado em dois possíveis casos, no caso de a amostra não conter o analito alvo ou no caso de conter em baixas concentrações, permitindo assim que nem todos os anticorpos do conjugado fiquem ligados ao antígeno. O antígeno presente na amostra e o que está imobilizado na linha de teste competem para se ligarem ao anticorpo conjugado.

No outro formato, o analito conjugado é imobilizado na plataforma de conjugação enquanto o anticorpo primário para o analito é imobilizado na linha de teste. Após a aplicação da solução que contém o analito vai ocorrer competição entre o analito e o analito marcado para a ligação ao anticorpo primário na linha de teste [26].



**Figura 2.12** – Esquema de um teste imunocromatográfico em formato competitivo (a). Quando a amostra contém o analito alvo e é depositada na plataforma de aplicação da amostra, vai de seguida migrar ao longo do TDR e a linha de teste irá apresentar cor (b). Quando a amostra não contém o analito alvo e é aplicada na plataforma de aplicação da amostra, vai migrar ao longo do TDR e irá ser visualizada cor na linha de controlo e na linha de teste. Adaptado de [26].

### 2.7.3 Formato de múltipla deteção

O formato de múltipla deteção é utilizado na deteção de diferentes alvos. O TDR neste caso apresenta um número de linhas de teste igual ao número de espécies alvo a serem analisadas. É um

Desenvolvimento de um teste de diagnóstico rápido para a detecção de malária em amostras clínicas método excelente para analisar múltiplos analitos simultaneamente sob as mesmas condições. É útil para o diagnóstico clínico, onde múltiplos analitos que são inter-dependentes devem ser detetados para determinar o estágio da doença [26].

## **2.8 A tecnologia *lab on paper* e suas aplicações em TDR**

Apesar das tecnologias mais avançadas que existem para o diagnóstico de malária implementadas nos países desenvolvidos, os países em vias de desenvolvimento não têm como as implementar, devido à falta de técnicos especializados, de laboratórios com todas as condições necessárias e sobretudo devido à sua condição económica. Torna-se, portanto, urgente o desenvolvimento de métodos para diagnosticar a malária que sejam de fácil utilização, que não necessitem de técnicos especializados e que apresentem um baixo custo, tais como os testes de diagnóstico rápido [27].

Uma das mais recentes aplicações da celulose é o papel bioativo, um produto de baixo custo e fácil produção, modificado com químicos biologicamente ativos, permitindo a detecção de agentes patogénicos. Outras aplicações promissoras do papel bioativo são o acondicionamento de alimentos, mascaras de hospitais, tiras de papel para a detecção e purificação de água não potável ou a averiguação de pesticidas não permitidos em produtos de culturas.

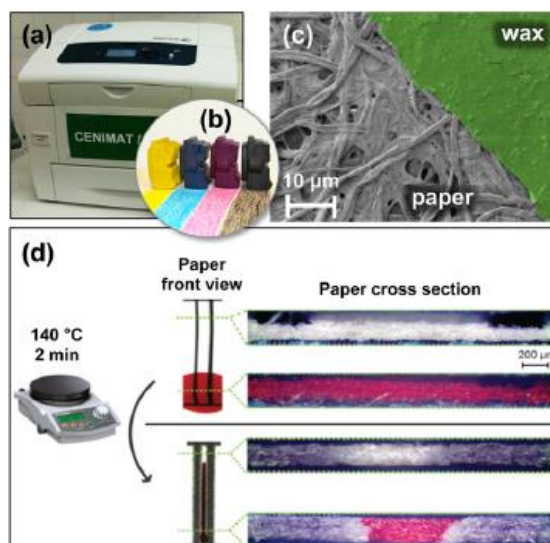
As matrizes de papel são de baixo custo e podem assumir um variado leque de formatos, sendo a sua estrutura porosa intrínseca apropriada para ensaios de fluxo lateral.

A tecnologia *lab on paper* foi introduzida em 2007 pelo grupo Whitesides e tem como base a produção de dispositivos com micro canais em papel hidrofílico pela modelação de paredes de polímeros hidrofóbicos ou cera. São criadas zonas de múltipla detecção para diferentes compostos alvo pela deposição de reagentes na superfície do papel, anticorpos, proteínas, entre outros. As redes tridimensionais dos canais podem ser fabricadas pelo empilhamento de camadas alternadas de papel padronizado e fita adesiva de dupla face com orifícios, bem como dispositivos de papel 2D completamente incluso. O movimento das amostras depositadas dentro dos canais é conduzido por capilaridade e quando a amostra atinge a zona de detecção ocorre uma reação, por exemplo colorimétrica ou um sistema de detecção eletroquímico que sinaliza a reação.

A tecnologia mais promissora para a produção de grandes quantidades de papel padronizado utiliza uma impressora de cera sólida para a impressão do *layout* do sensor em cera sólida hidrofóbica. O papel impresso é então processado utilizando um forno ou uma manta de aquecimento. Este procedimento irá permitir o derretimento da cera e a sua difusão vertical pelo papel poroso, criando

Desenvolvimento de um teste de diagnóstico rápido para a deteção de malária em amostras clínicas

barreiras hidrofóbicas que irão definir canais hidrofílicos, reservatórios de fluidos e zonas de reação (Figura 2.13).



**Figura 2.13** – Impressora Xerox ColorQube 8570 (a). Tinteiros de cera sólida (b). Imagem obtida por SEM da superfície do papel Whatman no.1 com e sem impressão de cera sólida, em que a verde está representada a impressão a cera e a cinzento as fibras do papel (c). Micrografias óticas da seção transversal do papel antes e depois da difusão de cera por toda a espessura do papel. Para realçar o efeito das barreiras hidrofóbicas foi utilizado um corante vermelho (d). Retirado de [28].

Entre outros obstáculos, os métodos para padronização de massa e imobilização de biomoléculas mais delicadas no papel, tais como, anticorpos ou antigénios, sondas de ácidos nucleicos ou enzimas ainda se encontra num estágio prematuro. A estabilidade de biomoléculas na superfície do papel a curto e a longo prazo necessita de ser otimizada e os ensaios atuais de bio reconhecimento carecem de sensibilidade. A imobilização de biomoléculas é influenciada pela porosidade e superfície química do papel.

O papel *Whatman* é fabricado a partir de fibras de algodão com elevada qualidade que tenham sido tratadas de forma a possuírem elevado conteúdo de celulose alfa (>98%) para garantir qualidade, reprodutibilidade e uniformidade. A celulose é um polímero constituído por uma longa cadeia de moléculas de  $\beta$ -glucose ligadas por ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas. O algodão de celulose difere da celulose da madeira principalmente por possuir um grau de polimerização e cristalinidade mais elevados. A cristalinidade indica o grau com que as moléculas da fibra estão empacotadas e paralelas umas às outras. O papel *Whatman* apresenta uma estrutura típica de celulose semi-cristalina [28].

O papel de filtro é um material altamente sofisticado, uma vez que pode ser fabricado fino, leve e flexível de acordo com a finalidade do mesmo. O principal constituinte do papel é a fibra de celulose, despertando interesse para diversas aplicações. Um líquido ao ser depositado em papel penetra na matriz da fibra hidrofílica sem ser necessário o auxílio de qualquer fonte externa. As fibras de celulose

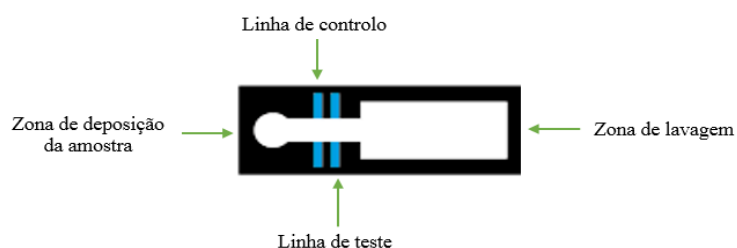
Desenvolvimento de um teste de diagnóstico rápido para a detecção de malária em amostras clínicas

também podem ser funcionalizadas, alterando então as suas propriedades de reatividade, permeabilidade, hidrofobicidade, entre outras. Recentemente, este material tem atraído bastante interesse para ser utilizado em sensores, dispositivos analíticos e clínicos, entre outros, devido à sua versatilidade, elevada abundância e ao seu baixo custo. Um imunoensaio consiste numa tira de papel com uma *sample pad*, onde se introduz a amostra, um *reagent pad*, contendo anticorpos conjugados a um indicador de sinal específico para um antígeno alvo, e uma linha de teste, para captura de anticorpos imobilizados na superfície. Quando a amostra é introduzida na *sample pad*, esta migra ao longo da tira de papel por ação de forças capilares, onde o antígeno presente na amostra se liga ao anticorpo sinal. O complexo antígeno-anticorpo sinal continua a fluir ao longo da tira de papel onde é posteriormente capturado na superfície pelo anticorpo de captura, obtendo-se um resultado positivo. O indicador de sinal pode ser microesferas de latex coloridas ou nanopartículas de ouro [29].

A utilização do papel em TDR apresenta inúmeras vantagens:

- Pouco dispendioso, podendo ser fabricado localmente na maioria dos países e a partir de recursos renováveis e recicláveis;
- É facilmente impresso, revestido e impregnado;
- A celulose é constituída maioritariamente por proteínas e biomoléculas *friendly*;
- É um ótimo filtro;
- É biodegradável ou facilmente incendiável;
- A sua estrutura porosa possibilita testes de fluxo lateral, separações cromatográficas e dispositivos microfluídicos pouco dispendiosos [30].

Na figura 2.14 está representado o teste de diagnóstico rápido desenvolvido para a dissertação.



**Figura 2.14** – TDR em papel de filtro (*Whatman* nº1). As setas a verde indicam os vários constituintes do teste. Pode-se observar os canais de cera a azul que vão formar barreiras hidrofóbicas, criando canais hidrofílicos.

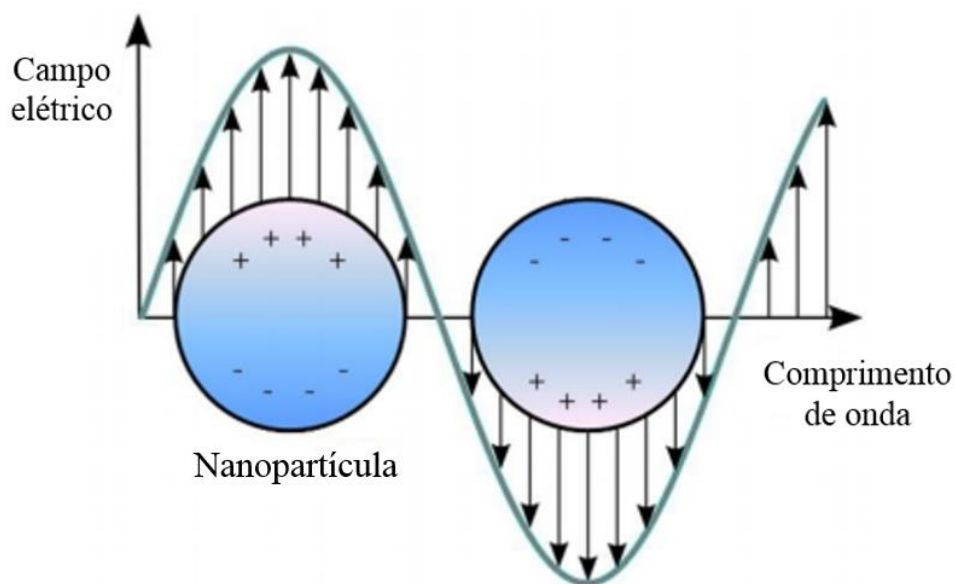
## 2.9 Nanopartículas de ouro como biomarcadores em imunoensaios

Nanotecnologia engloba ciência, engenharia e tecnologia conduzidas à nanoescala, operando no intervalo de 1-100 nm. Nanotecnologia não implica trabalhar apenas com materiais à nanoescala,

Desenvolvimento de um teste de diagnóstico rápido para a detecção de malária em amostras clínicas

implica também que esses materiais adquiram propriedades físicas, químicas, mecânicas e óticas diferentes, exatamente por se encontrarem à nanoescala. Quando uma partícula se encontra à nanoescala propriedades como a fluorescência, a condutividade elétrica, a reatividade química e o ponto de fusão são alteradas. O ouro à nanoescala ilustra na perfeição as propriedades únicas que advêm desta escala. As nanopartículas de ouro não apresentam cor amarela, como estamos habituados a observar à macroescala, mas sim uma cor vermelha ou roxa. À nanoescala os movimentos dos elétrons do ouro são confinados, daí as nanopartículas de ouro reagirem de maneira diferente com a luz [31].

As nanopartículas de ouro têm sido extensivamente estudadas devido às suas propriedades óticas únicas resultantes da banda de ressonância plasmonica de superfície localizada (LSPR). Quando a radiação eletromagnética interage com as nanopartículas conduz a uma oscilação coletiva dos elétrons à superfície das mesmas originando uma ressonância plasmonica de superfície [32], [33] (Figura 2.15)



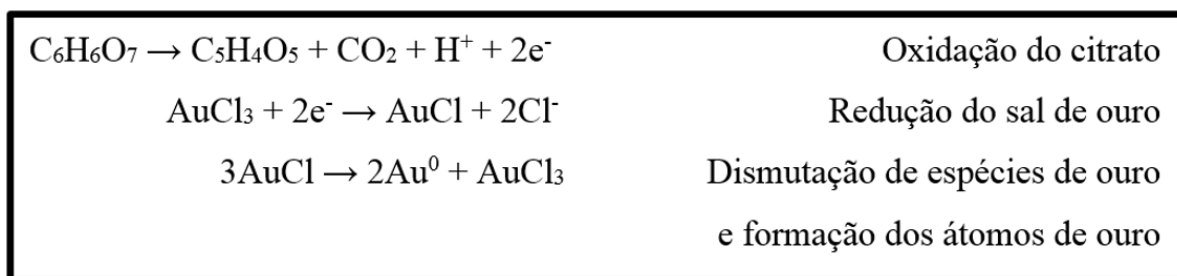
**Figura 2.15** – Esquema do fenômeno de LSPR. Os elétrons livres à superfície da nanopartícula iniciam o seu processo de oscilação devido á interação com a luz incidente. Adaptado de [32]

Estas possuem excepcionais coeficientes de absorção que vão permitir uma maior sensibilidade em métodos de detecção ótica em comparação com corantes convencionais. Uma solução coloidal de ouro apresenta uma banda LSPR a aproximadamente 520 nm e cor vermelha. Esta banda é pouco afetada pelo tamanho da partícula e pelo índice de refração do meio envolvente, mas bastante afetada pela forma da nanopartícula e pela distância inter-partícula. O aumento do campo eletromagnético na superfície das AuNP pela interação com a radiação eletromagnética fornece propriedades óticas

Desenvolvimento de um teste de diagnóstico rápido para a detecção de malária em amostras clínicas

interessantes com um grande potencial para ensaios de bio diagnóstico. O sucesso das AuNP em ensaios biológicos reside na flexibilidade de métodos de síntese gerando nanopartículas com as características pretendidas, a elevada solubilidade em água, adequada morfologia, tamanho de dispersão e funcionalização da superfície.

Existem vários métodos de síntese de nanopartículas de ouro, contudo, o mais utilizado é a redução química ou eletroquímica de Ouro (III) na presença de um agente de revestimento, isto é, um composto com a capacidade de se ligar à superfície da NP, bloqueando o seu crescimento e estabilizando o coloide no solvente utilizado. O controlo da forma e tamanho das nanopartículas é normalmente alcançado pela cuidadosa seleção das condições experimentais, nomeadamente, o agente redutor, o tempo de reação, a temperatura e o agente de revestimento com forte afinidade para a NP. Isto permite a síntese de AuNP com um bom tamanho de dispersão, contudo a NP só é solúvel em solventes orgânicos, requerendo assim, um passo adicional de extração das partículas em água. A redução do ouro pelo citrato de sódio segundo o método de Turkevich [34] é o método mais comum para a síntese de AuNPs esféricas devido à sua simplicidade e elevado rendimento. O revestimento das nanopartículas com citrato de sódio evita a agregação entre as mesmas devido à alta densidade de carga negativa proporcionada pelos grupos carboxilo do citrato à superfície das mesmas. A funcionalização das AuNP envolve o uso de ligandos bifuncionais, em que parte do ligando serve para a interação com a nanopartícula enquanto a outra é direcionada para o exterior da superfície para interações específicas com biomoléculas [35].

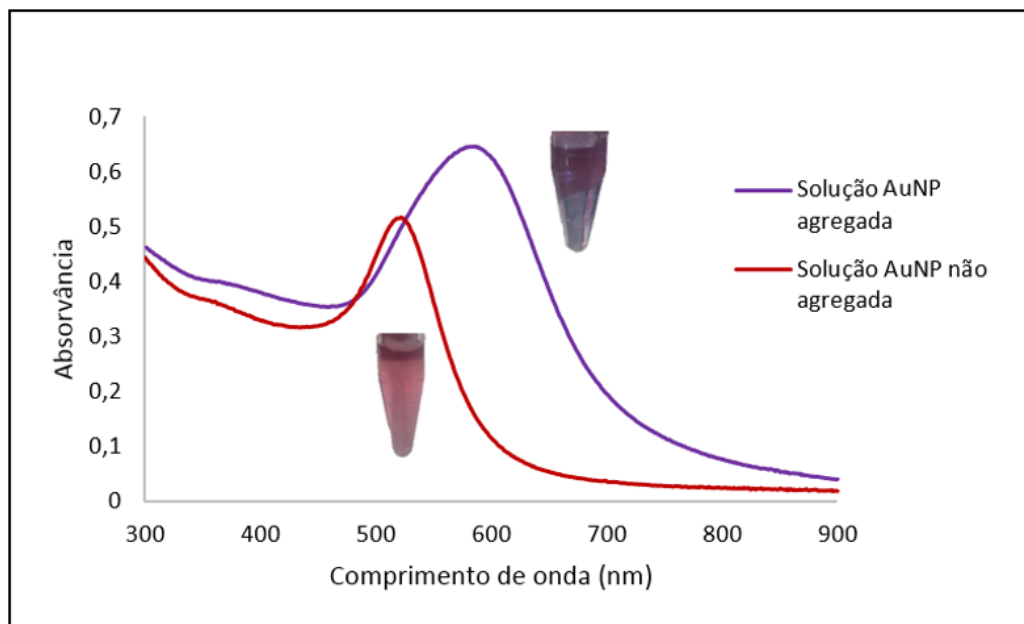


**Figura 2.16** – Reação de síntese das AuNP pelo método de Kimling. [34]

As propriedades óticas das AuNP alteram-se quando existe condução dos eletrões perto da superfície de cada partícula, ficando os mesmos deslocalizados, sendo partilhados entre partículas vizinhas, levando à formação de partículas agregadas. Quando isto ocorre a banda de LSPR desloca-se para energias mais baixas, ou seja, maior comprimento de onda, na gama do azul, deixando a solução de ter a cor vermelha. A espectroscopia de UV-visível é um método simples e confiável para a monitorização da estabilidade das AuNP. À medida que ocorre a destabilização das AuNP a banda vai diminuindo de intensidade, devido à depleção de NP estáveis. Também pode ocorrer o alargamento da banda ou a formação de uma segunda banda a maiores comprimentos de onda, devido à formação de

Desenvolvimento de um teste de diagnóstico rápido para a detecção de malária em amostras clínicas

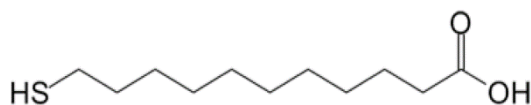
agregados [36]. Na figura 2.29 está representado um espectro de UV-Visível de uma solução de AuNP não agregada e agregada.



**Figura 2.17** – Espectros de UV-Visível de uma solução de AuNP não agregada (a vermelho) e agregada (a roxo). A solução não agregada apresenta um máximo de absorvância a 520 nm e a solução agregada a 587 nm.

A camada de citrato à superfície da nanopartícula pode ser substituída por outros ligandos com o objetivo de aumentar a sua estabilidade, tais como, ácidos mercaptocarboxílicos. Estes grupos são ligandos mais fortes do que o citrato de sódio proveniente da síntese. Alguns exemplos são o ácido mercaptoacético (MAA), o ácido mercaptopropionico (MPA) ou o ácido mercaptoundecanoico (MUA), ilustrado na Figura 2.18.

O grupo tiol (R-SH) é o grupo que apresenta a maior afinidade para a superfície de metais nobres, tais como o ouro (aproximadamente  $200 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) [37].



**Figura 2.18** - Ácido mercaptoundecanoico (MUA)

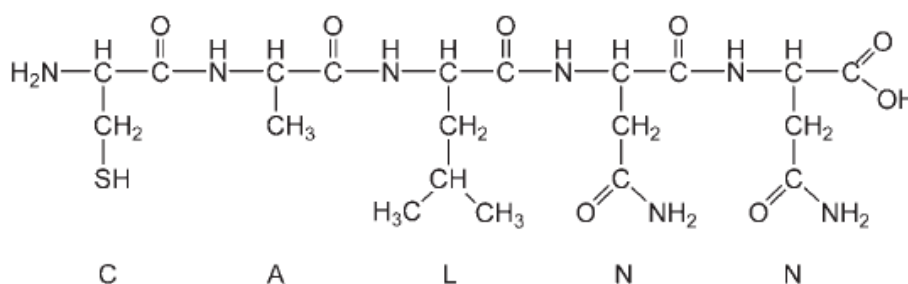
O pentapéptido Cys-Ala-Leu-Asn-Asn (CALNN), também um agente de funcionalização, ilustrado na Figura 2.19, foi construído com o propósito de reunir determinadas características, tais como, a uma elevada afinidade para o ouro, a capacidade de automontagem numa camada densa que exclui as moléculas de água e incluir um terminal hidrofílico que assegure a solubilidade e estabilidade em solventes aquosos.

Desenvolvimento de um teste de diagnóstico rápido para a detecção de malária em amostras clínicas

O grupo tiol da cadeia lateral do N-terminal da cisteína tem a capacidade de estabelecer uma ligação covalente com a superfície da nanopartícula de ouro. Esta interação pode ocorrer também ao nível do grupo amina do N-terminal, uma vez que, se sabe que tem uma elevada afinidade para o ouro.

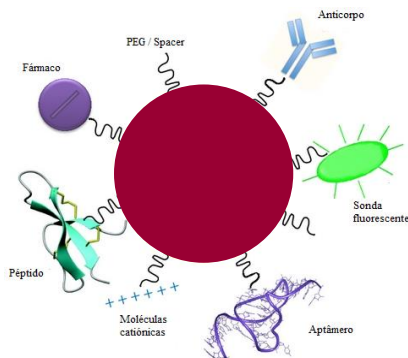
A presença de um grupo amónia carregado positivamente na proximidade do tiol acelera significativamente a cinética de adsorção de tióis a nanopartículas de ouro revestidas com citrato.

A alanina e a leucina nas posições 2 e 3, respetivamente, possuem cadeias laterais hidrofóbicas e foram escolhidas para promover a automontagem do péptido. As asparaginas que ocupam as posições 4 e 5 são aminoácidos não carregados e hidrofílicos e são responsáveis pela interação entre o anticorpo e a nanopartícula. [38], [39].



**Figura 2.19** – Pentapéptido Cys-Ala-Leu-Asn-Asn (CALNN)

Em meio biológico as nanopartículas (NP) podem interagir com diversas biomoléculas, tais como, proteínas, ácidos nucleicos, moléculas orgânicas, lípidos e inclusive com metabolitos biológicos, ilustrado na Figura 2.20, devido ao seu nano tamanho e elevado rácio superfície-massa. A adsorção de biomoléculas na superfície das nanopartículas pode ocorrer por diversas forças, tais como, pontes de hidrogénio, forças de Van der Waals, atracção electrostática, quimiossorção, entre outras. A composição, a hidrofobicidade, a presença de grupos funcionais específicos, pH e a temperatura afetam a adsorção de proteínas à superfície das nanopartículas. [40].



**Figura 2.20** – Nanopartícula funcionalizada com diferentes moléculas para diagnóstico e *drug delivery*.

Desenvolvimento de um teste de diagnóstico rápido para a deteção de malária em amostras clínicas

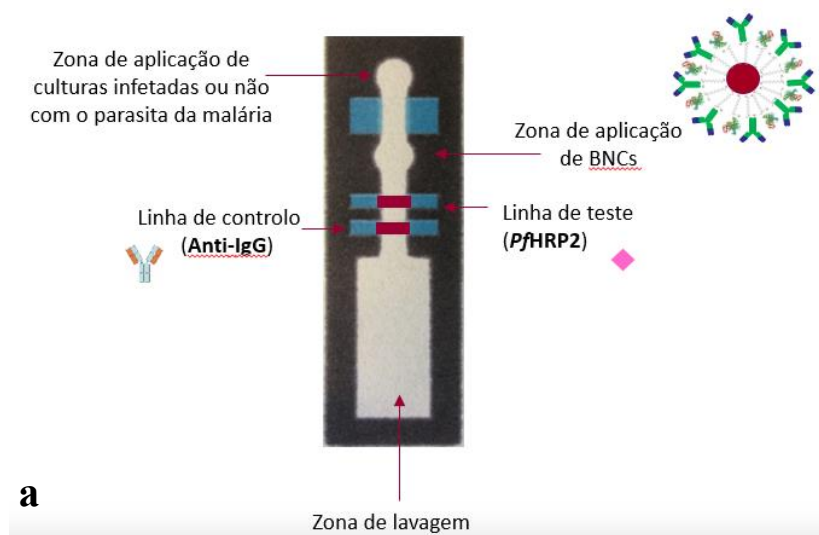
A bionanoconjugação entre as AuNP e anticorpo pode ocorrer por adsorção (ao ponto isoelétrico do anticorpo via interação electrostática), por ligação covalente entre a superfície da nanopartícula e o anticorpo ou recorrendo ao uso de moléculas adaptadoras. O uso de moléculas adaptadoras geralmente envolve a formação do complexo streptavidina-biotina. A vantagem que advém da ligação covalente quando comparada com a adsorção física é que a ligação impede a remoção competitiva dos anticorpos adsorvidos pelos componentes do sangue. Bionanoconjugação ótima envolve a ligação covalente do anticorpo através da região Fc, deixando o sítio de ligação ao antígeno Fab orientado para o meio de modo a preservar a sua função e num rácio de 1:1 de modo a permitir quantificação direta [25].

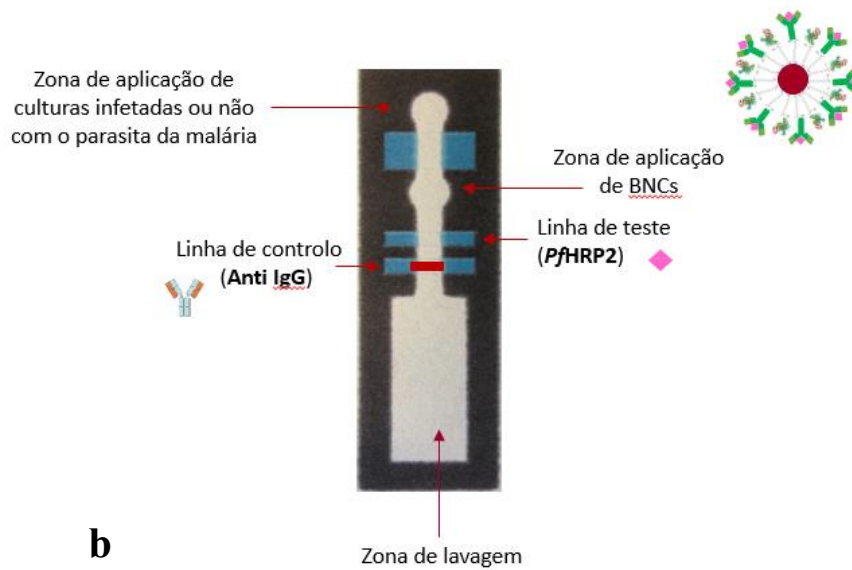
## 2.10 TDR baseado em bionanoconjugados

O teste de diagnóstico rápido desenvolvido utiliza como substrato o papel de cromatografia *Whatman* nº1. Para a formação dos bionanoconjugados as nanopartículas de ouro são inicialmente funcionalizadas com MUA ou CALNN de forma de promover a ligação ao anticorpo anti-*Pf*HRP2.

No teste de diagnóstico rápido irão existir, as linhas de teste e controlo, em que na primeira irá estar imobilizada a proteína que pretendemos analisar, a *Pf*HRP2 e na outra linha irá estar imobilizado o anti-IgG, um anticorpo secundário.

A solução de bionanoconjugados é aplicada na sua zona de aplicação no teste e absorvida através de um fluxo de capilaridade ao longo do papel. O antígeno a detetar na amostra liga-se especificamente aos bionanoconjugados, devido à forte ligação entre o antígeno e o anticorpo. Através de ligações competitivas, a solução a testar irá ou não ligar-se ao antígeno imobilizado na mesma e consoante se tratar de um doente infetado ou não com o parasita da malária, dar um resultado positivo ou negativo. Na Figura 2.21 encontra-se representado um esquema do TDR desenvolvido, apresentando um resultado negativo e positivo de infeção.





**Figura 2.21** – Esquema do TDR desenvolvido. Em (a) apresenta-se um resultado negativo e em (b) um resultado positivo.

Num resultado negativo, a amostra não contém o parasita da malária, então a solução de bionanoconjugados irá migrar pelo papel na sua forma AuNP-MUA-Anticorpo ou AuNP-CALNN-Anticorpo e liga-se tanto na linha de teste e de controlo, uma vez que irá ocorrer interação entre o anticorpo conjugado com AuNP e o anti-IgG imobilizado na linha de controlo e o antigénio imobilizado na linha de teste, visualizando-se cor vermelha nas duas linhas.

Num resultado positivo, o parasita presente na amostra liga-se aos bionanoconjugados e quando estes migram ao longo do papel e atingem a linha de teste não se irá visualizar cor na mesma, uma vez que todos os locais de ligação do anticorpo estão ocupados. Dessa forma, liga-se apenas à linha de controlo, visualizando apenas cor vermelha na mesma.

### 3 Procedimento Experimental

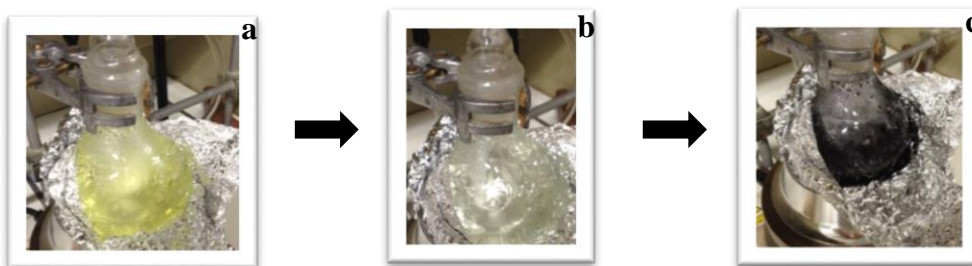
Neste capítulo serão descritos todos os passos experimentais para o desenvolvimento do teste de diagnóstico rápido, desde a síntese de nanopartículas de ouro, funcionalização com os diferentes agentes de revestimento e conjugação com o anticorpo monoclonal anti-*Pf*HRP2. Descrevem-se também a produção, expressão e purificação da proteína *Pf*HRP2, assim como todo o processo de desenvolvimento e otimização do TDR.

#### 3.1 Síntese de nanopartículas de ouro

As nanopartículas de ouro (AuNP) foram sintetizadas recorrendo ao método inicialmente desenvolvido por Turkevich e posteriormente otimizado por J. Kimling [34]. Para a síntese das AuNP todo o material foi mergulhado em água-régia durante cerca de 16 horas (mistura de ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>, MM = 63,01 g.mol<sup>-1</sup>, Panreac) e ácido clorídrico (HCl, MM = 36,46 g.mol<sup>-1</sup>, Sigma-Aldrich) na proporção de 1:3, respetivamente). No dia seguinte todo o material foi lavado com água mili-Q até eliminação total do ácido.

Para a preparação da solução de AuNP adicionou-se num balão de fundo redondo 100 mL de água mili-Q e 69,2 µL da solução de ácido tetracloroáurico (HAuCl<sub>4</sub>, MM = 339,79 g.mol<sup>-1</sup> 1,445 mM, solução de cloreto de ouro (III) a 30% wt, 99,99%). Adaptou-se um condensador ao balão e a solução foi submetida a aquecimento sob refluxo utilizando uma placa de aquecimento (P Selecta), sob agitação suave.

Quando a solução entrou em ebulição adicionou-se 10 mL de citrato do sódio tribásico di-hidratado (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub>.2H<sub>2</sub>O, MM = 339,79 g.mol<sup>-1</sup>, 38,8 mM, ≥ 99,0%, Sigma-Aldrich) e deixou-se reagir durante 15 minutos. Passados 15 minutos desligou-se o aquecimento e deixou-se a solução a agitar durante mais 15 minutos. Deixou-se arrefecer a solução de AuNP até atingir a temperatura ambiente. A solução inicialmente apresentava uma cor amarela, cor esta característica dos complexos de ouro e após a adição do citrato de sódio a solução ficou momentaneamente transparente e finalmente adquiriu a cor avermelhada, como se pode observar pela Figura 3.1. A solução de AuNP foi posteriormente caracterizada por espectroscopia de UV-Visível e armazenada a 4°C, no escuro, para posterior funcionalização.



**Figura 3.1** - Mudanças de cor obtidas durante a síntese de AuNP. A solução amarela corresponde ao ácido tetracloroáurico dissolvido em água mili-Q (a). A solução transparente corresponde ao passo de adição do citrato de sódio (b). A solução vermelha escura corresponde à solução coloidal de AuNP (c).

### 3.1.1 Caracterização das nanopartículas de ouro

As AuNP foram caracterizadas recorrendo à espectroscopia de UV-Visível (VARIAN Cary modelo 50 versão 3.0). Todos os espectros foram traçados na gama de comprimentos de onda entre 300 e 900 nm em células de quartzo (*Zuzi*) com 1 cm de percurso ótico. No espectro de UV-Visível da solução após síntese, esta solução coloidal de AuNP apresenta uma banda SPR característica com um máximo de absorvância a cerca de 520 nm.

De acordo com os parâmetros utilizados na síntese espera-se obter nanopartículas esféricas com um diâmetro médio entre 10-20 nm. O diâmetro e a concentração das mesmas foi determinado pelo método descrito por Haiss et al. [41]. Segundo este método, determina-se o quociente entre a absorvância do máximo da banda de SPR e a absorvância a 450 nm (Equação 1)

$$Y = \frac{Abs_{SPR}}{Abs_{450\text{ nm}}} \quad \text{Equação 1}$$

Esse valor é substituído em Y na equação 2, determinando-se assim o valor de  $x$  que corresponde ao diâmetro médio das nanopartículas de ouro.

$$Y = 0,335 \ln(x) + 0,7301 \quad \text{Equação 2}$$

Determinado então o diâmetro, é possível, por consulta do valor de coeficiente de extinção molar a 450 nm,  $\epsilon_{450\text{ nm}}$ , e desta forma pela Lei de Lambert-Beer, descrita pela equação 3, determinar a concentração das solução de AuNP.

$$[AuNP] = \frac{Abs_{450\text{ nm}}}{\epsilon_{450\text{ nm}}} \times \text{fator de diluição} \quad \text{Equação 3}$$

As AuNP utilizadas nesta presente dissertação apresentaram um diâmetro medio de 17 nm e uma concentração de 5,70 nM.

### **3.2 Funcionalização das nanopartículas de ouro com MUA ou CALNN**

A solução de AuNP foi funcionalizada com um volume previamente calculado de ácido mercaptoundecanoico (MUA) em etanol absoluto a uma concentração de 10 mM, para uma razão molar de AuNP-MUA de 1:5000. Deixou-se incubar a solução durante 2 horas à temperatura ambiente.

A solução de AuNP foi funcionalizada com um volume previamente calculado do pentapéptido Cys-Ala-Leu-Asn-Asn (CALNN) a uma concentração de 4,68 mM, para uma razão molar de AuNP-CALNN de 1:1000. Deixou-se incubar a solução durante cerca de 16 horas à temperatura ambiente.

### **3.3 Formação dos bionanoconjugados**

Durante o trabalho experimental utilizou-se três diferentes soluções de bionanoconjugados, AuNP-MUA-Anticorpo, AuNP-CALNN-Anticorpo e AuNP-CALNN-(EDC/NHS)-Anticorpo. Para tal, foi necessária a funcionalização da solução de AuNP como anteriormente descrito.

O volume de 30 mL de uma solução de AuNP a uma concentração de 2,5 nM previamente funcionalizada com MUA ou CALNN pelo processo descrito em 1.2 foi distribuído em *ependorfs* de 1,5 mL e foi adicionada a solução de anticorpo monoclonal anti-*Pf*HRP2 (*Antibodies online*), numa razão molar de 1:25. Os conjugados incubaram aproximadamente 16 horas a 4°C, após o que foram centrifugados (*Eppendorf* 5810R) durante 30 minutos, a 4°C e a 16000 x g. Retirou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento em 200 µL de solução de BSA (10 mg/mL, Sigma Aldrich). Os bionanoconjugados incubaram com a solução de BSA durante 60 minutos e a 4°C. Em seguida centrifugou-se novamente os bionanoconjugados durante 20 minutos, a 4°C e a 16000 x g. Retirou-se novamente o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento em 250 µL de tampão fosfato de sódio 5 mM a pH=7,2. Procedeu-se novamente a uma centrifugação durante 10 minutos, a 4°C e a 16000 x g. Por último, descartou-se novamente o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento em tampão fosfato de 5 mM a pH=7,2 para um volume final de 5 mL. A concentração final de bionanoconjugados é de 15 nM, com base no valor de AuNP determinado, feitos os cálculos para os efeitos de diluição.

Preparou-se também bionanoconjugados AuNP-MUA-Anticorpo ou AuNP-CALNN-Anticorpo com uma razão molar de anticorpo inferior à anterior, razão de 1:10. Todo o procedimento experimental para a formação destes bionanoconjugados foi realizado de acordo com a metodologia acima descrita.

Desenvolvimento de um teste de diagnóstico rápido para a deteção de malária em amostras clínicas

Foram também formados bionanoconjugados AuNP-MUA-Anticorpo recorrendo a nanopartículas de ouro com 52 nm de diâmetro. Todo o procedimento experimental para a formação destes bionanoconjugados foi executado tal como descrito acima, exceto a razão molar de AuNP-MUA, que para estas nanopartículas foi de 1:40.000. Esta razão molar foi estabelecida em estudos anteriores pela Mestre Mariana Romão, que verificou que a partir desse valor toda a superfície das AuNP já se encontrava coberta pelo MUA. A razão molar de AuNP-MUA-anticorpo foi 1:125. A solução de AuNP de 52 nm foi sintetizada pelo Mestre Miguel Peixoto do grupo da Professora Doutora Eulália Pereira, UCIBIO, REQUIMTE, Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, nossos colaboradores.

Na formação dos bionanoconjugados AuNP-CALNN-(EDC/NHS)-Anticorpo as nanopartículas de ouro foram de igual modo funcionalizadas com CALNN. Após a funcionalização com CALNN foi adicionado 1 mM em EDC (Cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodimida) e 2 mM em NHS (N-hidroxissuccinimida). As soluções aquosas de EDC/NHS foram incubadas com as AuNP funcionalizadas durante 1 hora à temperatura ambiente. Seguidamente foi adicionado o anticorpo monoclonal anti-*Pf*HRP2 que incubou durante 2 horas a 4°C. Todo o procedimento experimental para a formação destes bionanoconjugados foi executado tal como está descrito acima.

### **3.4 Estabilidade das AuNP funcionalizadas e dos bionanoconjugados**

Para a realização dos ensaios da avaliação da estabilidade coloidal das AuNP com diferentes tipos de revestimentos variou-se dois parâmetros, o pH do meio e a força iónica.

Estes estudos de estabilidade foram realizados para quatro diferentes tipos de solução de nanopartículas de ouro: AuNP-Citrato, AuNP-MUA, AuNP-CALNN e AuNP-MUA-Anticorpo.

#### **3.4.1 Variação da força iónica do meio**

Para estudar a estabilidade das AuNP variando a força iónica do meio utilizou-se uma solução de cloreto de sódio (NaCl, *Scharlau*). Variou-se a concentração de NaCl de 0 a 2,5 M e manteve-se constante a concentração de AuNP para um volume final de 1 mL. O procedimento adotado consistiu na preparação de várias soluções diferentes distribuídas por vários *eppendorfs*. Aos vários *eppendorfs* adicionou-se então, uma concentração constante de AuNP a 3 nM, concentrações variadas NaCl na gama de 0 a 2,5 M e um volume de água mili-Q apropriado de modo a perfazer o volume final de 1 mL de solução.

Após a preparação das soluções descritas acima foram traçados os espectros de UV-visível (VARIAN Cary modelo 50 versão 3.0).

### 3.4.2 Variação do pH do meio

Para o estudo da estabilidade das AuNP variando o pH do meio utilizou-se duas soluções diferentes, ácido clorídrico (HCl 0,1 M, *Sigma Aldrich*) e hidróxido de sódio (NaOH 0,1 M, *Sigma Aldrich*). O procedimento adotado consistiu na preparação de várias soluções, com uma concentração de AuNP constante e igual a 1 nM e um volume adequado de água mili-Q adicionado a cada uma das soluções de modo a obter-se um volume final de 1 mL. Preparadas as soluções variou-se o pH do meio de cada solução, adicionando-se a solução ácida ou básica gradualmente e individualmente com o intuito de se obter diferentes valores de pH na gama de 2 a 10, recorrendo a um eletrodo de pH para essas medições (pH-meter basic 20+, Crison). Após a alteração do pH do meio de cada solução esperou-se rigorosamente 2 minutos até à medição das absorvâncias no espectrofotómetro de UV-visível (VARIAN Cary modelo 50 versão 3.0).

A uma concentração constante de AuNP adicionou-se gradualmente a solução ácida ou básica com o intuito de se obter diferentes valores de pH na gama de 2 a 10, recorrendo a um eletrodo de pH para essas medições (pH-meter basic 20+, Crison).

Para o estudo da estabilidade das diferentes soluções de AuNP recorreu-se à equação 4. A razão de agregação traduz-se no quociente entre o valor de absorvância a cerca dos 600 nm (espécie agregada) e o valor de absorvância a cerca de 520 nm (espécie não agregada). Todos os espectros foram traçados na gama de comprimentos de onda entre 300 e 900 nm em células de quartzo (*Zuzi*) com 1 cm de percurso ótico.

$$\text{Razão de agregação} = \frac{\text{Abs da espécie agregada}}{\text{Abs da espécie não agregada}} \quad \text{Equação 4}$$

### 3.5 Produção, expressão e purificação da proteína PfHRP2

A produção de PfHRP2 teve como base o método descrito por Ndonwi et al. [42]. Foi utilizada a estirpe *E. coli* BL 21/DE3 como célula hospedeira e o vetor de expressão pET 15b.

Com o objetivo de se obter colónias isoladas preparou-se placas de Petri com meio LBagar sólido e ampicilina a 100 µg.mL<sup>-1</sup> e inoculou-se com as células recombinantes de *E. coli* BL21. As placas foram incubadas numa estufa a 37 °C e incubou-se durante aproximadamente 16 horas. Confirmou-se o aparecimento de colónias isoladas.

Preparou-se meios LB líquidos para o pré-inóculo. A 100 mL de meio LB líquido adicionou-se ampicilina a 100 µg.mL<sup>-1</sup> e uma colónia isolada de células recombinantes de *E. coli* BL21. O pré-inóculo foi então colocado num agitador orbital a 210 rpm e a uma temperatura de 37 °C durante sensivelmente 16 horas.

Desenvolvimento de um teste de diagnóstico rápido para a detecção de malária em amostras clínicas

No dia seguinte retirou-se 35 mL de cada pré-inóculo e adicionou-se aos meios LB líquidos de 1 L, que continham ampicilina a 100 µg/mL. As soluções foram incubadas a 37 °C e a 210 rpm até atingirem uma densidade ótica a 600 nm entre 0,75 e 0,9. Após atingida a densidade ótica desejada adicionou-se 50 µL do indutor IPTG (1 M) para uma concentração final de 0,05 mM. Os meios foram então colocados num agitador orbital durante 20 horas, a uma temperatura de 16 °C e a 200 rpm.

No dia seguinte as soluções foram centrifugadas a 4 °C numa centrífuga *Beckman Coulter Avanti J26-XPI*, rotor JA-10 durante 40 minutos a 17,696 x g. Após centrifugação dos meios, descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento (células bacterianas) em tampão de ligação (Tris 20mM pH=8, NaCl 500 mM, Imidazole 50 mM), adicionou-se 800 µL de cocktail inibidor de proteases (Sigma-Aldrich) e congelou-se.

Descongelou-se então as amostras com a finalidade de lisar as células num sistema de *French Press*, adicionou-se um pouco de DNase e fez-se três passagens a uma pressão de 1250 psi. Após a lise celular centrifugou-se as amostras a 3835 x g, 4 °C e durante 90 minutos. Após a centrifugação do conteúdo aproveitou-se o sobrenadante e descartou-se o sedimento. Ao sobrenadante adicionou-se 800 µL de cocktail inibidor de proteases (Sigma-Aldrich).

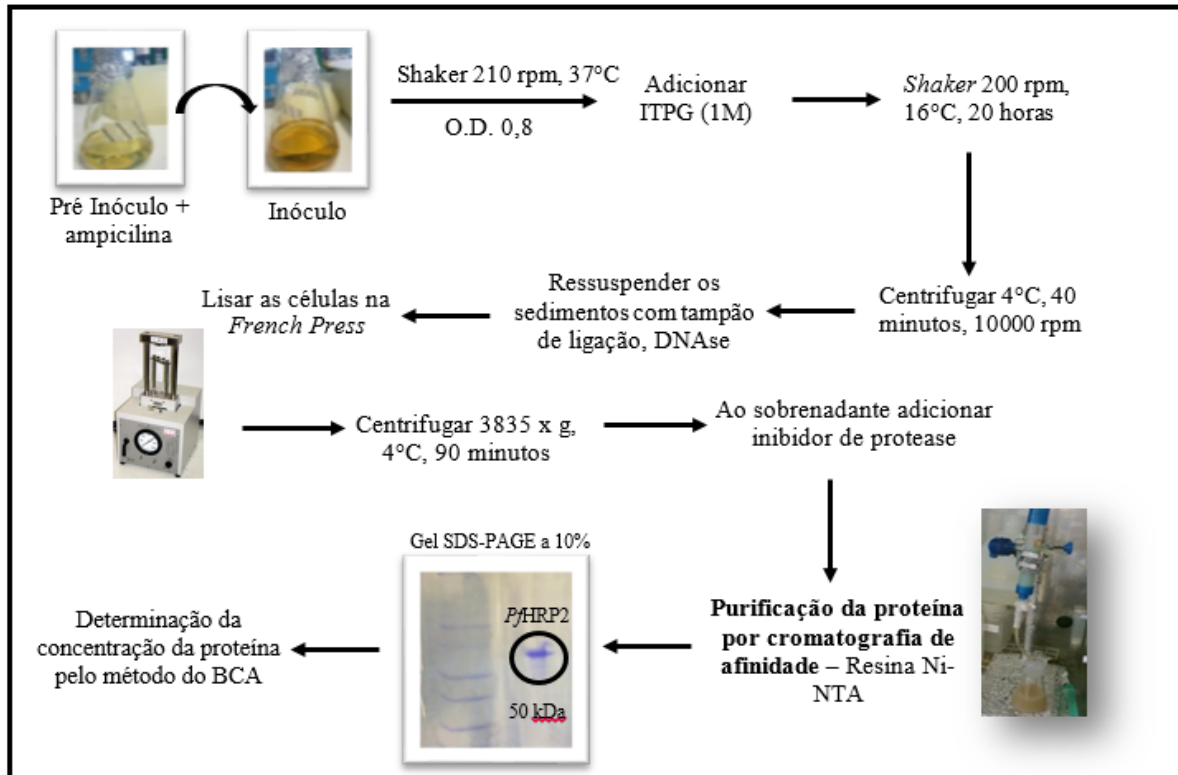
Para a purificação da proteína, recorreu-se à cromatografia por afinidade, utilizando uma resina de níquel-agarose ácido nitriloacético (Ni-NTA), uma vez que foi inserido no vetor de expressão da *PfHRP2* uma cauda de 6 histidinas que apresenta uma elevada afinidade para o níquel. A resina foi introduzida na coluna e equilibrada com aproximadamente 250 mL de tampão de ligação (Tris 20mM pH=8, NaCl 500 mM, Imidazole 50 mM). A resina foi então retirada da coluna e misturada com a solução de proteínas durante 2 horas a 4 °C e com agitação lenta (placa de agitação magnética, P selecta). Passadas 2 horas introduziu-se a mistura na coluna para dar início à purificação da proteína *PfHRP2*. Adicionou-se tampão de lavagem (Tris 20 mM pH=8, NaCl 500 mM, Imidazole 250 mM) até se obter à saída da coluna uma solução com uma densidade ótica inferior a 0,1 a 280 nm. Seguidamente, utilizou-se tampão de eluição (Tris 20 mM pH=8, NaCl 500 Mm, Imidazole 1 M) para recolher a proteína ligada à resina, até se obter novamente uma densidade ótica inferior a 0,1 a 280 nm. Este processo foi repetido as vezes necessárias até toda a solução ser introduzida na coluna e eluída da mesma.

As frações que continham proteína apresentavam densidade ótica igual ou superior a 0,1 e foram concentradas num Amicon com membrana de tamanho de poro de 30 kDa a 4° C. Após concentração foi efetuada a troca de tampão para TBS (Tris 50 mM pH=7,4, NaCl 150 mM) em centricons com uma membrana de tamanho de poro de 3 kDa.

Após a produção e purificação, é avaliada a pureza da proteína através de um gel SDS-PAGE a 10%. Foram preparadas as amostras com tampão de amostra (10 + 10 µL) e levadas à ebulição durante 5 minutos. Após a adição das amostras ao gel, este correu durante 60 minutos a 150 V em tampão Tris-Glicina num suporte da BioRad.

Desenvolvimento de um teste de diagnóstico rápido para a detecção de malária em amostras clínicas

Para determinar a concentração da proteína PfHRP2 recorreu-se ao método do ácido bicinonínico (BCA). Todo o procedimento efetuado desde o passo de produção, purificação da proteína PfHRP2 e avaliação da sua pureza está representado na Figura 3.2.



**Figura 3.2** – Representação esquemática do processo de produção e purificação da proteína PfHRP2, desde o crescimento até à determinação da concentração da mesma.

### 3.6 Projeção do TDR recorrendo à tecnologia lab-on-paper

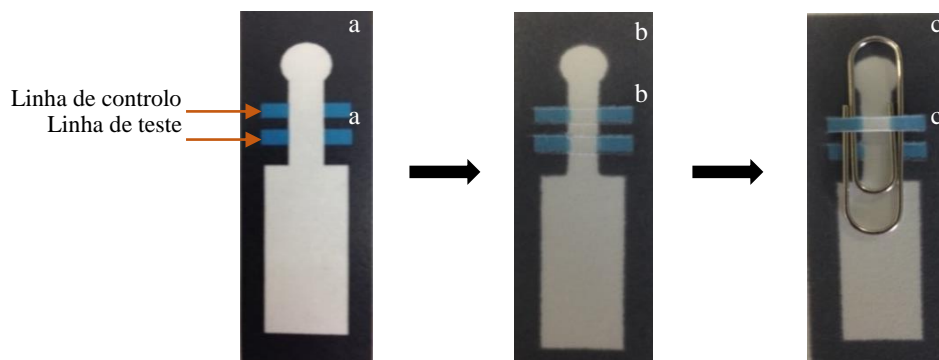
O teste de diagnóstico rápido foi desenhado recorrendo ao programa informático *adobe illustrator* CC. Para a impressão do teste utilizou-se uma impressora com tinteiros de cera, *Xerox ColorQube* 8570, e a impressão foi feita em papel de cromatografia *Whatman* nº1 (*Whatman Cellulose Chromatography Paper Grade 1*). Impresso o teste, o próximo passo foi a difusão da cera ao longo da espessura do papel. Para tal, aqueceu-se o papel *Whatman* nº1 numa placa de aquecimento (*ROBAX*®) durante 2 minutos a cerca de 140°C, tal como se pode observar na Figura 3.3. O derretimento da cera e a sua difusão vertical pelo papel poroso cria barreiras hidrofóbicas que irão definir canais hidrofílicos. A projeção e impressão do TDR com recurso à tecnologia *lab-on-paper* foi realizada no CENIMAT-I3N. Esta tecnologia tem sido desenvolvida pela minha co-orientadora Professora Doutora Elvira Fortunato.

Desenvolvimento de um teste de diagnóstico rápido para a deteção de malária em amostras clínicas

Após a impressão do teste foi necessário recortar as linhas de controlo e de teste. Recortadas as linhas de controlo e de teste foi introduzido um interruptor nas mesmas, um clip metálico, com a finalidade de levantar as linhas, isto para, ao se depositar a gota de anticorpo secundário (*IgG anti-mouse Sigma*) na linha de controlo e de antígeno na linha de teste não ocorrer a migração das soluções para os outros componentes do TDR, como ilustra a Figura 3.4.



**Figura 3.3** – TDR impressos em papel de cromatografia Whatman nº1 a serem difundidos numa placa de aquecimento durante 2 minutos a 140°C.



**Figura 3.4** – TDR impresso em papel de filtro *Whatman* nº1 (a), TDR após a difusão da cera pelo papel e recorte das linhas de teste e controlo (b), TDR com interruptor (c).

### 3.6.1 Evolução do TDR

Ao longo do trabalho experimental houve a necessidade de modificar e evoluir o formato e os componentes do TDR. Na Figura 3.5 estão representados os vários formatos utilizados ao longo do projeto.

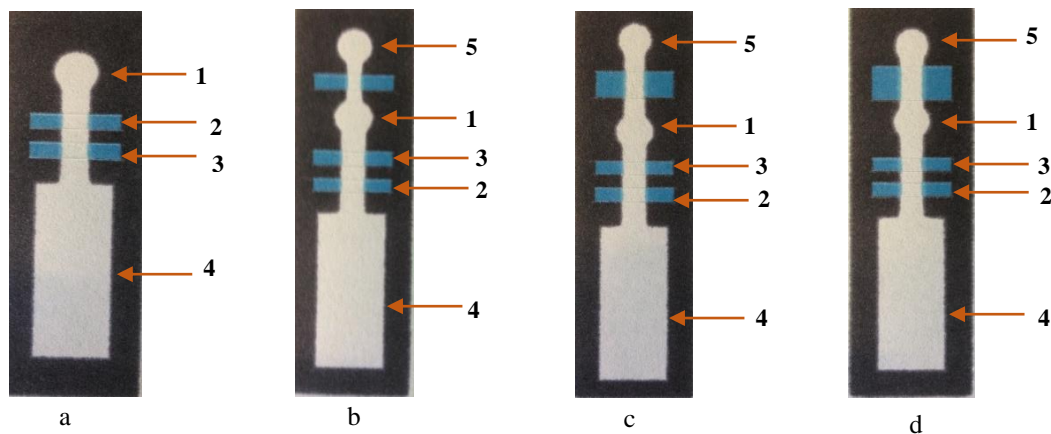
Inicialmente o TDR era constituído por uma zona de aplicação dos bionanoconjugados, a linha de controlo e de teste e a zona de lavagem (Figura 3.5a). Posteriormente adicionou-se um novo elemento ao TDR, uma zona de deposição das culturas infetadas e não infetadas (Figura 3.5b). Após

Desenvolvimento de um teste de diagnóstico rápido para a deteção de malária em amostras clínicas

a simulação de alguns resultados positivos e negativos, houve a necessidade de aumentar o canal por onde migram as culturas (Figura 3.5c), uma vez que as culturas apresentaram dificuldade em migrar através de um canal estreito tal como inicialmente foi projetado o TDR (Figura 3.5b). No entanto, o formato do TDR representado na Figura 3.5c também apresentou desvantagens, por se apresentar ainda estreito, sendo a migração das culturas lenta, o que conduziu à necessidade de se alargar ainda mais o canal (Figura 3.5d).

Relativamente à aplicação das culturas de sangue infetadas e não infetadas com a *PfHRP2* no TDR da Figura 3.5a e nos restantes TDR da Figura 3.5, existe uma diferença notória entre eles. No TDR da Figura 3.5a como não existe uma zona de aplicação das culturas, estas terão que ser depositadas diretamente sob a solução dos bionanoconjugados após a sua secagem, enquanto nos restantes TDR as culturas infetadas/não infetadas e a solução dos bionanoconjugados possuem diferentes locais de aplicação no teste.

É de salientar que as linhas de controlo e de teste foram trocadas de posição, na Figura 3.5a a linha de teste vem a seguir à linha de controlo, enquanto nas Figuras 3.5b, 3.5c e 3.5d a linha de controlo vem a seguir à linha de teste, tal como se pode visualizar pela ordem dos números na Figura 3.5.



**Figura 3.5** – Evolução dos componentes do TDR. 1 – Zona de aplicação dos BNCs, 2 – Linha de controlo, 3 – Linha de teste, 4 – Zona de lavagem, 5 – Zona de deposição das culturas infetadas/não infetadas.

### 3.6.2 Princípio teórico do TDR

O princípio de funcionamento do teste de diagnóstico rápido desenvolvido baseia-se num formato competitivo. Na presença de infeção vai ocorrer a ligação do antígeno presente nas culturas com o anticorpo conjugado com as AuNP. Quando a solução de bionanoconjugados atinge a linha de teste e de controlo será visualizada uma linha vermelha na linha de controlo. A visualização de cor na linha de controlo diz respeito à interação entre o anticorpo anti-IgG imobilizado na mesma e o anticorpo anti-*PfHRP2* conjugado com as AuNP. A linha de teste será incolor, uma vez que, todos os locais de

Desenvolvimento de um teste de diagnóstico rápido para a deteção de malária em amostras clínicas

ligação do anticorpo conjugado com as AuNP estão ocupados com o antígeno presente nas culturas de um doente infetado com malária. Assim não irá ocorrer ligação entre o anticorpo conjugado com as AuNP e o antígeno imobilizado na linha de teste.

Caso se trate do caso de um doente não infetado com malária, as culturas não contêm o parasita da malária. Quando as culturas atingem a zona do TDR onde se encontram os bionanoconjugados imobilizados não ocorrerá qualquer tipo de ligação. A solução irá migrar até à linha de teste que contém imobilizada a PfHRP2, ocorrendo interação com o anticorpo anti-PfHRP2 conjugado com as AuNP, verificando-se assim o aparecimento de uma linha vermelha na linha de teste. Na linha de controlo também se irá visualizar o aparecimento de uma linha vermelha, uma vez que, os bionanoconjugados se irão ligar ao anticorpo anti-IgG imobilizado na linha de controlo.

### **3.6.3 Otimização da zona de aplicação dos bionanoconjugados**

No desenvolvimento do TDR foram estudados bionanoconjugados formados por nanopartículas de ouro funcionalizadas com MUA ou CALNN e conjugadas com uma razão molar de anticorpo anti-PfHRP2 1:10 ou 1:25. Com vista à determinação da quantidade ideal de bionanoconjugados a aplicar, variou-se o volume de solução de bionanoconjugados a uma concentração de 15 nM a aplicar entre 30 a 60  $\mu\text{L}$ .

### **3.6.4 Otimização da linha de controlo**

Para a otimização da linha de controlo variou-se quatro parâmetros, o tempo de incubação, a diluição e o volume de anticorpo secundário, bem como o volume da solução de bionanoconjugados. Utilizou-se diferentes bionanoconjugados, AuNP-MUA-Anticorpo, AuNP-CALNN-Anticorpo e AuNP-CALNN-(EDC/NHS)-Anticorpo. A solução *stock* de anticorpo anti-IgG encontrava-se a 11  $\text{mg.mL}^{-1}$ .

O tempo de incubação e o volume de anticorpo secundário, assim como o volume da solução de bionanoconjugados foram variados de igual modo para todas as soluções de bionanoconjugados a aplicar no teste. O tempo de incubação da gota de anticorpo secundário foi desde 15 minutos a 16 horas, o volume de solução de anticorpo secundário depositado na linha de controlo foi de 2 a 5  $\mu\text{L}$ .

As diluições de anticorpo secundário efetuadas foram diferentes consoante a solução de bionanoconjugados a aplicar na zona de deposição da amostra. Ao aplicar-se AuNP-MUA-Anticorpo utilizou-se diluições de anticorpo secundário até 1:100 e utilizando bionanoconjugados AuNP-CALNN-Anticorpo diluições de 1:200.

Ao fim do tempo de secagem retirou-se o interruptor e aplicou-se a solução de bionanoconjugados. O reconhecimento entre o anticorpo secundário e os bionanoconjugados demora apenas alguns segundos.

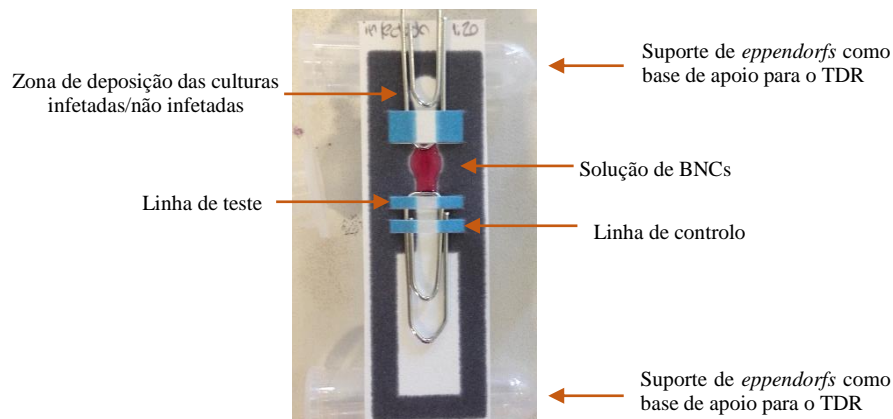
### 3.6.5 Otimização da linha de teste

Na deteção da linha de teste variou-se a concentração de antígeno *PfHRP2* de 0,5 a 2,6 mg.mL<sup>-1</sup> e o volume de antígeno entre 2 e 6 µL. O tempo de secagem da gota de antígeno é em média entre 15 a 20 minutos, tal como o tempo de secagem da gota de anticorpo secundário na linha de controlo.

### 3.6.6 Otimização da zona de aplicação das culturas infetadas e não infetadas

Para a simulação do TDR de um doente infetado ou não com malária, usaram-se culturas de sangue infetadas e não infetadas com o parasita da malária. Essas culturas foram amavelmente cedidas pelo grupo de investigação liderado pelo Professor Doutor Thomas Hänscheid. As culturas infetadas continham um grau de parasitemia de aproximadamente 8%.

Inicialmente, para o procedimento de simulação do TDR de um doente infetado ou não com o parasita da malária, colocou-se os interruptores para a aplicação da gota de anticorpo secundário na linha de controlo, da gota de antígeno *PfHRP2* na linha de teste e da solução de bionanoconjugados, como ilustra a Figura 6. Foi também necessário a criação de um suporte para o TDR não estar em contacto direto com uma superfície plana, caso contrário iria ocorrer a transferência das soluções depositadas no TDR para a bancada. O suporte consistiu em apoiar o TDR em dois *ependorfs*, um em cada extremidade, como se pode observar na Figura 3.6.



**Figura 3.6** – Ilustração do TDR após deposição da solução de BNCs e das gotas de anticorpo secundário e antígeno e do suporte de apoio do teste.

Após a secagem das soluções retirou-se os interruptores e aplicou-se a solução de culturas infetadas ou não infetadas na zona de deposição das mesmas. A solução migra até à zona de deposição dos bionanoconjugados que se encontram imobilizados no papel, que por sua vez vão migrar, e originar uma cor vermelha na linha de controlo. Na linha de teste apenas se visualizará cor no caso de se tratar de um resultado negativo.

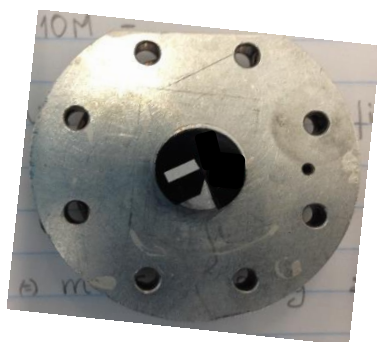
Desenvolvimento de um teste de diagnóstico rápido para a detecção de malária em amostras clínicas

Foram utilizados diferentes bioconjugados conjugados com diferentes razões de anticorpo anti-IgG. Utilizou-se bioconjugados AuNP-CALNN-Anticorpo com razão molar de anticorpo de 1:10 e 1:25, AuNP-MUA-Anticorpo com razão molar de anticorpo primário 1:10 e 1:25 e AuNP-CALNN-(EDC/NHS)-Anticorpo com razão molar de 1:25.

Em suma, na otimização do teste positivo e negativo variou-se diferentes parâmetros, nomeadamente, o tipo de solução de bioconjugados, a razão molar de AuNP – anticorpo e o tamanho das AuNP, na medida em que se testou nanopartículas com diâmetro entre os 15-20 nm e de 52 nm. Variou-se também o volume da solução de bioconjugados, o volume de culturas infetadas e não infetadas, bem como a concentração do antigénio *Pf*HRP2 a aplicar na linha de teste e a diluição de anticorpo secundário na linha de controlo. Foram também utilizados TDR com diferentes formatos, mencionados no ponto 3.6.1 na Figura 3.5.

### **3.7 Preparação do papel *Whatman* nº1 para análise por microscopia eletrónica de varrimento**

Para que as amostras possam ser caracterizadas por microscopia eletrónica de varrimento (SEM), estas têm que ser condutoras. Uma vez que a amostra em estudo não apresenta condutividade superficial, estas tiveram que ser metalizadas, através da aplicação de um revestimento ultrafino de ouro melhorando assim a sua condutividade elétrica. A preparação do papel *Whatman* nº1 envolveu o corte de uma pequena porção do mesmo e a sua colagem numa fita de carbono, como ilustra a Figura 3.7.



**Figura 3. 7** – Preparação do papel *Whatman* nº1 para análise por SEM.

A análise foi realizada num microscópio eletrónico de varrimento Carl Zeiss AURIGA Crossbeam SEM-FIB pela pós doutorada Daniela Gomes do CENIMAT-I3N (Figura 3.8). Na obtenção das imagens foi utilizada uma tensão de aceleração de 2 kV, uma abertura de diafragma de 30  $\mu$ m e uma distância de trabalho entre a amostra e a coluna de SEM de aproximadamente 5,7 mm.



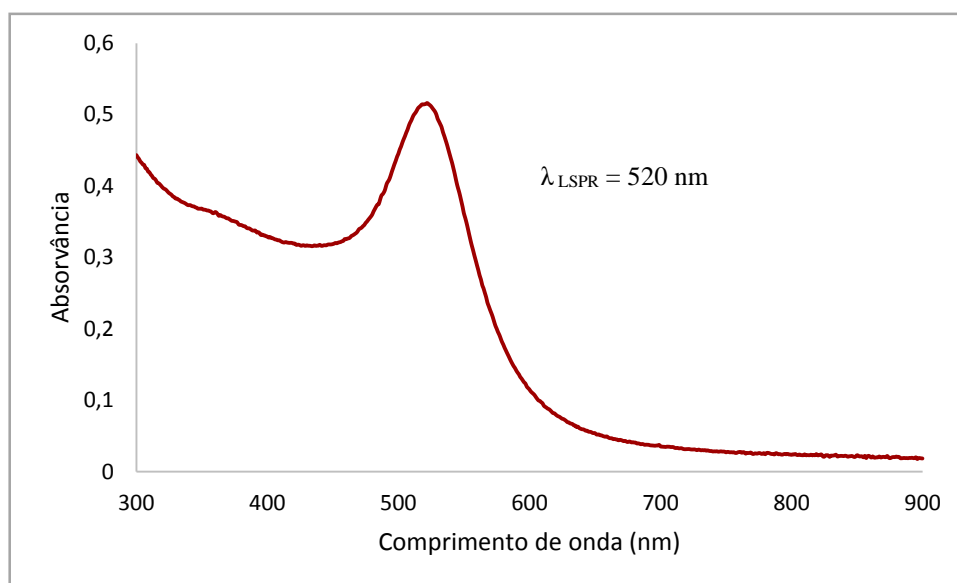
**Figura 3. 8**– Equipamentos de microscopia eletrónica de varrimento.



## 4 Apresentação e Discussão de Resultados

### 4.1 Síntese e caracterização de nanopartículas de ouro

A metodologia utilizada para a síntese de nanopartículas de ouro, descrita por Turkevich [34] relevou ser reprodutível, na medida em que todas as soluções de AuNP apresentam uma banda LSPR característica situada a aproximadamente 520 nm, como se pode observar na Figura 4.1. A eficácia desta metodologia é também comprovada através da obtenção de nanopartículas de ouro com um diâmetro variável compreendido entre 10 – 20 nm.



**Figura 4.1** – Espectro de UV-Visível de AuNP com 17 nm de diâmetro e a uma concentração de 5,70 nM. A banda LSPR encontra-se situada a 520 nm.

Durante o processo de síntese de AuNP a solução passou por diferentes fases. Inicialmente a solução de sal de ouro apresentava uma cor amarela devido aos complexos de ouro. Quando a solução entrou em ebulição foi adicionado o citrato de sódio, o agente redutor e estabilizador do crescimento que funciona como agente de revestimento. A função do citrato de sódio é reduzir todo o ácido tetracloroaurico a ouro metálico, permanecendo a solução incolor durante alguns segundos. Formam-se então núcleos de ouro que crescem à conta da entrada de mais ouro, formando nanopartículas. Estas são revestidas e estabilizadas pelo citrato de sódio, apresentando uma cor vermelha escura característica de uma solução coloidal de AuNP com diâmetros de cerca de 15 nm. À medida que as nanopartículas de ouro vão crescendo a banda LSPR vai-se deslocando para comprimentos de onda maiores. O crescimento das AuNP estabiliza em cerca de 17 nm de diâmetro, correspondendo a um máximo de absorvância perto de 520 nm.

Desenvolvimento de um teste de diagnóstico rápido para a detecção de malária em amostras clínicas

O diâmetro médio e a concentração das AuNP foi determinado pelo método descrito por Haiss et al [41]. O primeiro passo do cálculo diz respeito ao quociente entre a absorvância do máximo da banda de LSPR e a absorvância a 450 nm, apresentado na equação 1 do 3.1.1.

$$Y = \frac{Abs_{LSPR}}{Abs_{450\text{ nm}}} = \frac{0,516}{0,308} = 1,675$$

O valor obtido é substituído na equação 2 do ponto 3.1.1, determinando-se o valor de  $x$ , que corresponde ao diâmetro médio das AuNP.

$$Y = 0,335 \ln(x) + 0,7301 \Leftrightarrow \frac{1,675 - 0,7301}{0,335} = \ln(x) \Leftrightarrow x = 17 \text{ nm de diametro}$$

Calculado o diâmetro das AuNP é possível determinar a concentração das mesmas, recorrendo ao valor de  $\epsilon$  tabelado e aplicando a lei de Lambert-Beer, representada na equação 3 do ponto 3.1.1.

$$[AuNP] = \frac{Abs_{450\text{ nm}}}{\epsilon_{450\text{ nm}}} \times \text{fator de diluição} = \frac{0,308}{3,24 \times 10^8} \times 6 = 5,70 \text{ nM}$$

Obteve-se então uma solução coloidal de AuNP com um diâmetro médio de 17 nm, a uma concentração de 5,70 nM.

## 4.2 Funcionalização de AuNP com MUA ou CALNN

Funcionalizou-se a solução coloidal de AuNP com MUA numa razão molar de 1:5000 e uma solução coloidal de AuNP com CALNN a uma razão molar de 1:1000. A razão molar ótima para que ocorresse revestimento total com MUA ou CALNN já tinha sido determinada anteriormente no laboratório, como tal prosseguiu-se os estudos com as razões molares acima referidas.

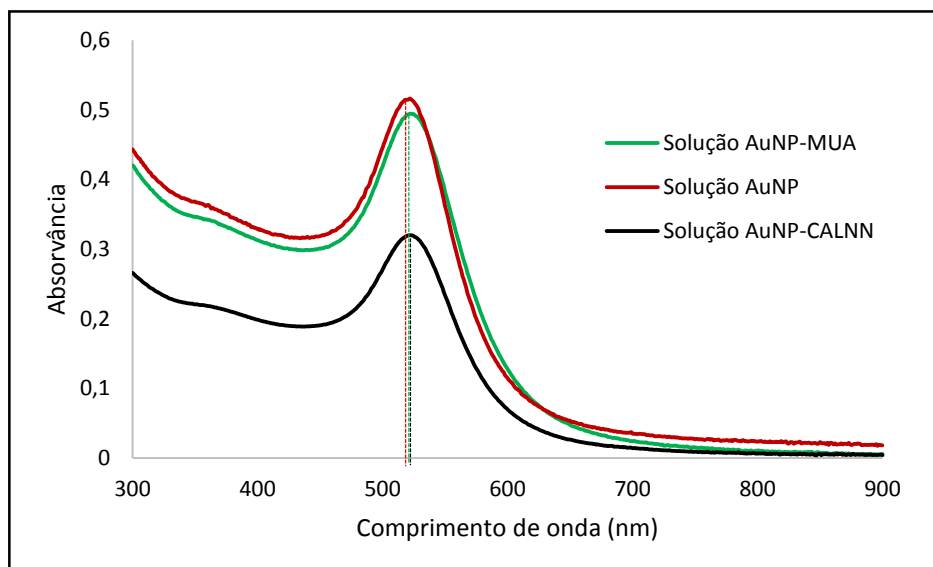
De modo a avaliar se a funcionalização com MUA ou CALNN tinha sido bem-sucedida traçou-se o espectro de UV-Visível para confirmar o deslocamento da banda de LSPR para comprimento de onda superior ao comprimento de onda da banda de LSPR de uma solução de AuNP-citrato. Tipicamente ocorre um desvio do máximo da banda LSPR de aproximadamente 2-3 nm.

Na Figura 4.2 encontram-se representados os espectros de UV-Visível de uma solução de AuNP-citrato, AuNP-MUA e AuNP-CALNN.

A solução de AuNP-MUA apresenta um máximo de absorvância a 522 nm e a solução de AuNP-CALNN nm exibe um máximo de absorvância a 523 nm. Assim sendo, confirma-se que ocorreu um deslocamento da banda de LSPR de 2 nm no caso da solução AuNP-MUA e de 3 nm para a solução

Desenvolvimento de um teste de diagnóstico rápido para a detecção de malária em amostras clínicas

de AuNP-CALNN comparativamente com a banda de LSPR das AuNP-citrato que exibe um máximo de absorvância a 520 nm.



**Figura 4. 2** – Espectro de UV-Visível de soluções AuNP, AuNP-MUA e AuNP-CALNN.

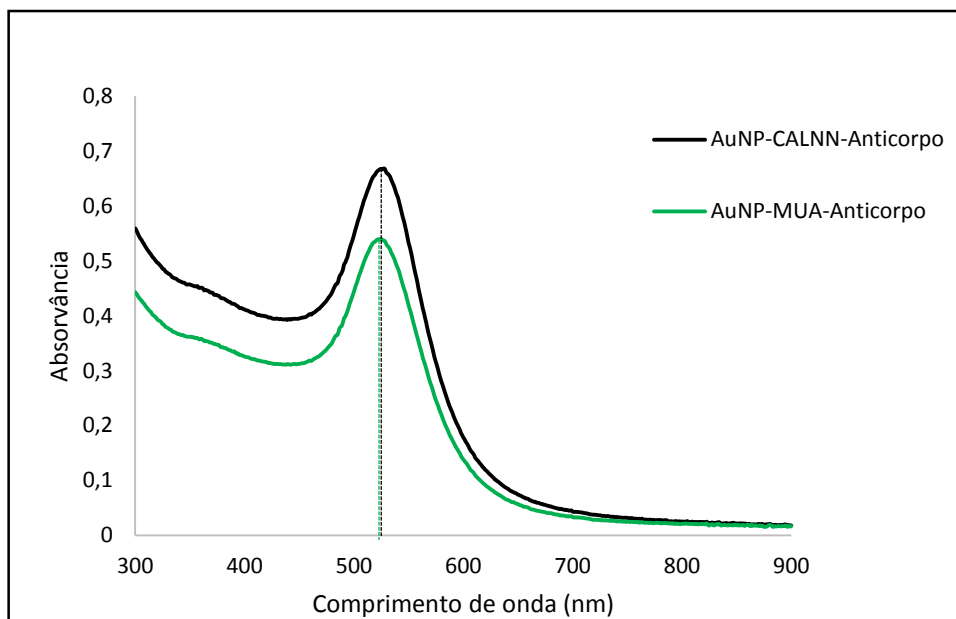
### 4.3 Formação dos bionanoconjugados

A formação dos bionanoconjugados decorreu tal como está descrito no ponto 3.3 do procedimento experimental.

Para comprovar a formação dos mesmos foram traçados os espectros de UV-Visível dos conjugados de AuNP com MUA ou CALNN, após a conjugação com o anticorpo anti-*Pf*HRP2, como ilustra a Figura 4.3.

As AuNP-MUA apresentaram um máximo de absorvância a cerca de 522 nm (ver ponto 4.2) e após a conjugação com o anticorpo ocorreu um desvio de 3 nm, apresentando agora o máximo da banda de LSPR a 525 nm, como ilustra a Figura 4.3.

Em relação às AuNP-CALNN, estas apresentam um máximo de absorvância a 523 nm (ver ponto 4.2) e após conjugação com o anticorpo, ocorreu um deslocamento da banda de aproximadamente 4 nm, sendo que o máximo da banda de LSPR alterou para 527 nm, como ilustra a Figura 4.3.

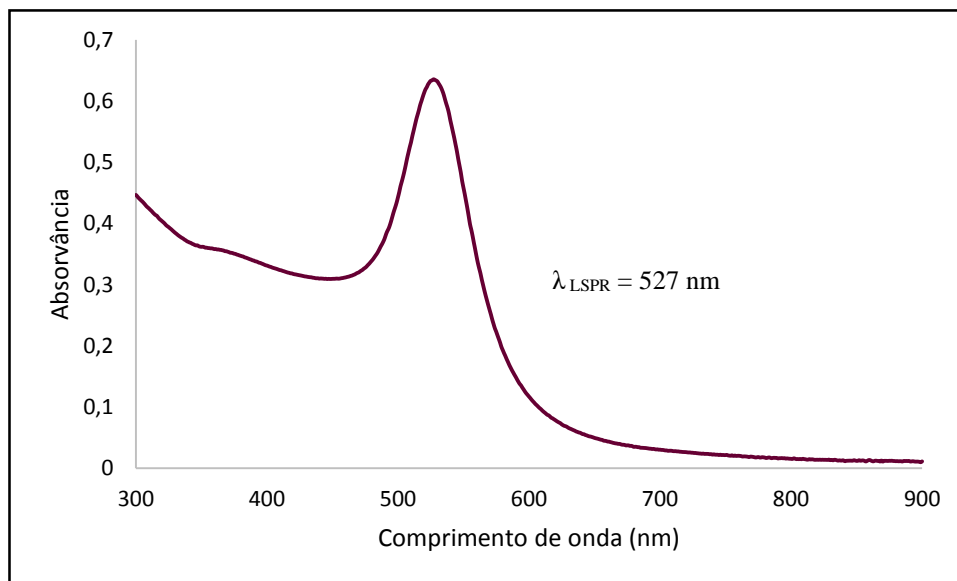


**Figura 4.3** – Espectro de UV-Visível de AuNP-CALNN-Anticorpo e AuNP-MUA-Anticorpo.

#### 4.4 Caracterização de AuNP de 52 nm

Foram também utilizadas nanopartículas de ouro de 52 nm com a finalidade de melhorar a detecção entre o bionanoconjugado e o anticorpo anti-IgG imobilizado na linha de controlo e o antigénio *PfHRP2* imobilizado na linha de teste. As AuNP de 52 nm, possuem uma área superficial cerca de 8 vezes superior à área superficial das AuNP com um diâmetro de 17 nm. Assim sendo, pensa-se que o uso de AuNP de maior diâmetro do que 17 nm poderá aumentar a sensibilidade do teste, uma vez que será possível conjugar um maior número de moléculas de anticorpo à sua superfície, existindo assim por nanopartícula um maior número de locais disponíveis para ligação ao anticorpo e ao antigénio. As AuNP de 52 nm apresentam uma intensidade de cor que pode ser até 4x superior à intensidade de cor das AuNP de 17 nm de diâmetro, representando uma enorme vantagem na detecção da linha de teste e de controlo.

Foi traçado um espectro de UV-Visível da solução para confirmar o seu diâmetro e concentração e para avaliar o seu estado de agregação. O diâmetro e a concentração da solução de AuNP foram determinados recorrendo ao método de Haiss et al. [41]. As AuNP apresentam um diâmetro médio de 52 nm e encontram-se a 0,17 nM (Figura 4.4).



**Figura 4.4** – Espectro de UV-Visível de AuNP com 52 nm de diâmetro e a uma concentração de 0,17 nM. A banda LSPR encontra-se situada a 527 nm.

O espectro de UV-Visível da Figura 4.4 não apresenta indícios de agregação, uma vez que, a banda de LSPR exibe uma forma estreita e um máximo a 527 nm tal como era esperado, a um comprimento de onda superior ao de uma solução de nanopartículas de ouro de 17 nm.

## 4.5 Estabilidade das nanopartículas e bionanoconjugados

Na realização dos ensaios de estabilidade foram estudadas AuNP revestidas com citrato de sódio (proveniente da síntese), AuNP funcionalizadas com MUA ou CALNN e AuNP funcionalizadas com MUA e conjugadas com o anticorpo anti-*Pf*HRP2. Com estes ensaios pretendeu-se averiguar qual dos agentes de revestimento confere uma maior estabilidade às nanopartículas de ouro e qual o ponto de agregação para cada caso estudado.

Foi efetuada a variação da força iónica e do pH do meio, sendo a concentração de NaCl variada numa gama de 0 a 2 M e o pH de 2 a 10.

### 4.5.1 Variação da força iónica

Os ensaios de estabilidade variando a força iónica foram realizados com nanopartículas de ouro revestidas com citrato de sódio, proveniente da síntese, o MUA e o CALNN.

Para os estudos de estabilidade foi necessário calcular a razão de agregação para cada solução de AuNP com um diferente revestimento e para os bionanoconjugados, em função da força iónica (concentração de NaCl adicionada à solução).

Desenvolvimento de um teste de diagnóstico rápido para a detecção de malária em amostras clínicas

O cálculo da razão de agregação foi efetuado de acordo com a equação 4 descrita no ponto 3.4.2 do procedimento experimental. Quando o NaCl se encontra em solução vai ocorrer a sua dissociação em iões  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ . Os iões  $\text{Na}^+$  vão interagir com as cargas negativas das moléculas que revestem as AuNP e essa interação vai enfraquecer as forças repulsivas entre cada nanopartícula, favorecendo então a agregação entre elas.

Observando a Figura 4.5, é possível verificar que as AuNP-Citrato se encontram completamente agregadas a cerca de 0,1 M de NaCl e atingem o ponto de meia agregação a 0,065 M de NaCl. Em relação às AuNP-MUA é observável que agregam completamente a 0,25 M de NaCl e atingem o ponto de meia agregação a cerca de 0,15 M. Comparando estes dois revestimentos, as AuNP-MUA apresentam maior estabilidade à medida que se aumenta a força iónica do meio. O MUA possui numa das extremidades um grupo carboxilo que favorece a ligação ao anticorpo e na outra um tiol. É através do grupo  $-\text{SH}$  que ocorre a ligação do MUA à AuNP, uma vez que existe uma grande afinidade entre superfícies de metais nobres, como é o caso do ouro, e os grupos tíóis, o que confere então à AuNP uma maior estabilidade. O citrato de sódio não possui nenhum grupo tiol, pelo que a sua ligação electrostática à AuNP é mais fraca e mais fácil de destabilizar.

As AuNP-CALNN agregam completamente a uma concentração de sal muito superior quando comparadas com as AuNP-Citrato e AuNP-MUA. A sua agregação ocorre a uma concentração de sal de 0,7 M e possuem um ponto de meia agregação por volta dos 0,3 M. Conclui-se então que o CALNN é o agente de revestimento mais resistente a variações de força iónica, comparativamente com os anteriores. A estabilidade da AuNP é aumentada através da presença do grupo tiol e ainda de interações coesivas laterais entre os aminoácidos do péptido (interações hidrofóbicas ou por pontes de hidrogénio), isto é, a combinação dos aminoácidos Cys-Ala-Leu-Asn-Asn contribui fortemente para a estabilidade que o péptido confere às AuNP. A elevada estabilidade que o CALNN oferece às AuNP provem também da camada auto-montada compacta que este forma em torno da AuNP, no caso do CALNN, esta interpretação é reforçada pela elevada densidade que o péptido confere às AuNP, tornando assim difícil a sua destabilização.

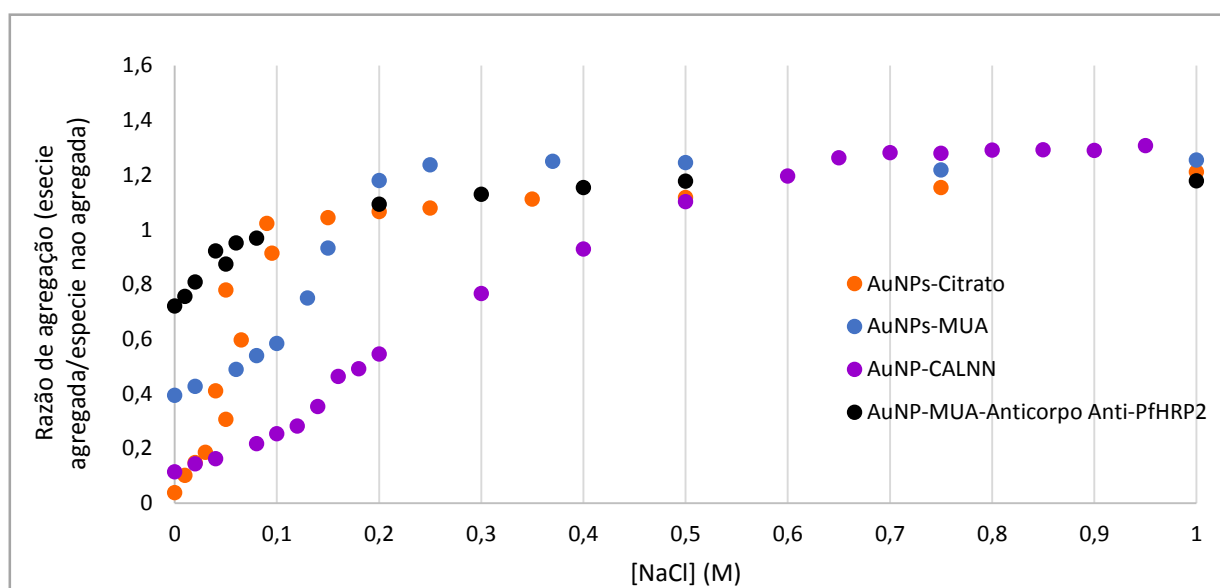
Estudou-se também a estabilidade da solução AuNP-MUA-Anticorpo sem bloqueio com BSA. Esta solução apresentou agregação, após a conjugação com o anticorpo anti-*Pf*HRP2 durante cerca de 16 horas. A adição do anticorpo usualmente provoca alguma agregação à solução e como não foi efetuado o passo de bloqueio com BSA nem os passos de lavagem com tampão como está descrito no ponto 3.3 do procedimento experimental a solução não voltou ao estado colóide.

Pela Figura 4.5 observa-se que a solução de AuNP-MUA-Anticorpo se encontra completamente agregada a 0,4 M de NaCl e o ponto de meia agregação ocorreu a aproximadamente 0,05 M de NaCl. De forma a ser mantida a estabilidade dos bionanoconjugados deverá ser efetuado o bloqueio com BSA. Para qualquer uma das soluções a razão de agregação torna-se constante quando todas as nanopartículas em solução já se encontram agregadas e a adição de mais quantidade de sal não varia o seu estado de agregação.

Na Tabela 4.1 encontram-se os valores de concentração de NaCl aos quais as diferentes soluções de AuNP atingiram o ponto de meia agregação.

**Tabela 4. 1** - Valores de concentração de NaCl aos quais as diferentes soluções de AuNP atingiram o ponto de meia agregação.

	AuNP- Citrato	AuNP-MUA	AuNP-CALNN	AuNP-MUA-Anticorpo
Ponto de meia agregação	0,065 M	0,15 M	0,3 M	0,05 M



**Figura 4.5** – Razão de agregação de diferentes soluções de nanopartículas de ouro e bionanoconjugados em função da variação da concentração de NaCl.

#### 4.5.2 Variação do pH

Na realização dos ensaios de estabilidade com variação do pH do meio de 2 a 10 foram estudadas nanopartículas de ouro revestidas com o citrato de sódio, que provem da síntese, MUA e CALNN. O cálculo da razão de agregação foi efetuado de acordo com a equação descrita no ponto 1.4 do procedimento experimental.

O efeito da variação do pH na agregação das nanopartículas é a neutralização de cargas à superfície das mesmas, isto é, cada molécula que está a revestir as AuNP possui um determinado pKa e quando o pH do meio é igual ao valor do pKa dos agentes de revestimento ocorre uma redução das forças de repulsão entre cada nanopartícula, possibilitando a agregação.

A solução de AuNP encontra-se inicialmente numa gama de pH entre 5,5 e 6.

Desenvolvimento de um teste de diagnóstico rápido para a deteção de malária em amostras clínicas

Pela análise da Figura 4.6, observa-se que de pH 10 a 4 as nanopartículas estudadas não apresentam agregação, esta é somente verificada a valores de pH inferiores a 4. O ponto de agregação das nanopartículas de ouro revestidas com citrato de sódio ocorre a pH igual a 3, o que está de acordo com a literatura, sendo o pKa do citrato de sódio de 3,13 [43].

Em relação às nanopartículas de ouro funcionalizadas com MUA e CALNN o mesmo não se verifica. O ponto de agregação das AuNP-MUA é a pH 3,5 e das AuNP-CALNN é a pH 2,5, valores de pH inferiores o valor de pKa do MUA que corresponde a 4,8 [44] quando este se encontra imobilizado numa superfície de ouro ou ao valor do pKa do CALNN de 4 [38].

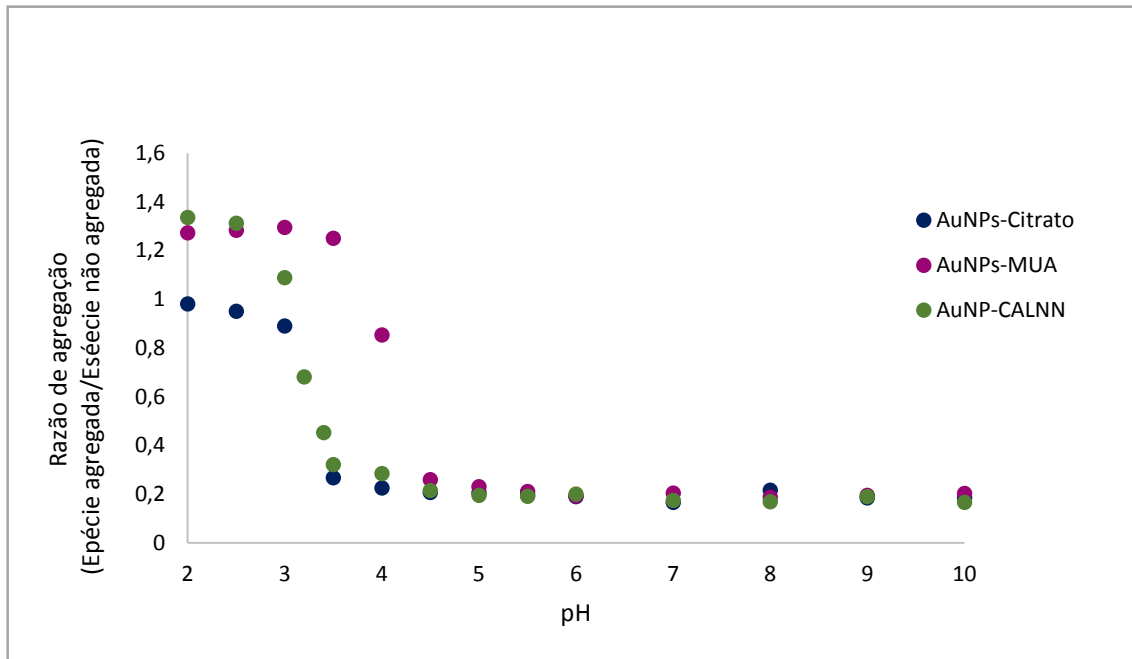
O fato de as nanopartículas funcionalizadas com MUA e CALNN não apresentarem o ponto de agregação ao mesmo valor ou aproximado do valor do pKa dos respetivos agentes de revestimento pode dever-se ao fato de a funcionalização não ter sido bem-sucedida, isto é, pode não ter sido completa e as AuNP não adquiriram uma monocamada uniforme de MUA ou CALNN, tornando-as mais suscetíveis a agregação. Para reforçar esta hipótese é de salientar que o pH a que solução de AuNP-MUA e AuNP-CALNN agregam se aproxima mais do valor do pKa do citrato de sódio, do que dos pKa dos seus agentes de revestimento.

A pH básico as AuNP são estáveis e não sofrem qualquer agregação, devido ao pKa dos agentes de revestimento, como se pode ver pela Figura 4.6.

Na Tabela 4.2 encontram-se os valores de pH aos quais as diferentes soluções de AuNP atingiram o ponto de agregação.

**Tabela 4. 2** - Valores de pH aos quais as diferentes soluções de AuNP atingiram o ponto de agregação.

	<b>AuNP-Citrato</b>	<b>AuNP-MUA</b>	<b>AuNP-CALNN</b>
<b>Ponto de agregação</b>	3	3,5	2,5



**Figura 4.6** - Razão de agregação de diferentes soluções de nanopartículas de ouro e bionanoconjugados em função da variação do pH do meio

## 4.6 Produção, expressão e purificação da proteína *PfHRP2*

O processo de produção e purificação da proteína *PfHRP2* necessita de otimizações futuras, uma vez que as quantidades de proteína obtidas por litro de cultura têm sido até ao momento muito reduzidas e são produzidas quantidades muito dispare de produção para produção. Em produções anteriores foram obtidos valores de  $3,8 \text{ mg.mL}^{-1}$  e  $0,78 \text{ mg.mL}^{-1}$  de concentração de proteína.

As placas com meio LBagar sólido que foram inoculadas com células recombinantes de *E. coli* BL21 apresentaram no dia seguinte crescimento bacteriano com colónias isoladas, o que nos permite concluir que a temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$  é a temperatura ótima para ocorrer crescimento bacteriano. O tempo também é um fator chave, na medida em que, se a incubação continuar após as 16 horas o número de colónias isoladas vai diminuindo, ocorrendo um espalhamento do crescimento.

Após a incubação das colónias em meio líquido foi monitorizada a densidade ótica do crescimento de modo a garantir que as células bacterianas eram induzidas a uma densidade ótica entre 0,75 a 0,9, assegurando assim que as mesmas se encontravam na fase exponencial do crescimento e que eram viáveis, para se induzir a produção de antígeno recombinante com IPTG, um análogo não metabolizável da lactose. De facto, o plasmídeo pET15b que expressa o antígeno recombinante, apresenta um promotor T7, que é induzido pela presença de IPTG.

As soluções bacterianas foram centrifugadas com a finalidade de separar o conteúdo bacteriano (sedimento) do sobrenadante que contém meio de crescimento. Ao sedimento adicionou-se tampão de ligação e inibidor de proteases para que estas enzimas, endógenas de *E. coli* e que são libertadas para

Desenvolvimento de um teste de diagnóstico rápido para a deteção de malária em amostras clínicas

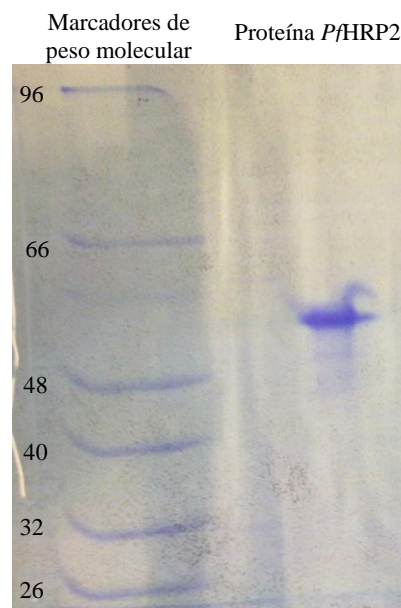
o meio aquando da lise celular, não quebrem as ligações peptídicas que ligam os aminoácidos entre si, mantendo as proteínas estruturadas.

Antes do processo de lise celular adicionou-se também DNase à amostra para digerir o DNA genómico, tornando assim a solução menos viscosa, o que facilita a sua passagem na *French Press* [45]. A *French Press* utiliza altas pressões com o objetivo de partir as membranas celulares, para que todo o conteúdo proteico seja libertado das células bacterianas.

Procedeu-se à purificação da proteína *PfHRP2* utilizando uma resina de níquel-NTA. No vetor de expressão foi inserida uma cauda de 6 histidinas, que possuem uma elevada afinidade para o níquel. Pelo facto de não estar carregada ao pH fisiológico a cauda de His não afeta o *enrolamento* das proteínas e na maioria dos casos não interfere com a estrutura ou função da proteína de fusão [46].

Quando a solução proteica é eluída na coluna, ao passar pela resina, a proteína *PfHRP2* irá ficar agarrada à mesma, ao contrário das restantes proteínas, que iriam ser eluídas. O tampão de eluição apresenta uma elevada concentração em imidazole para permitir a eluição da proteína de interesse da resina, uma vez que esta compete com a cauda de histidinas na ligação ao metal.

Purificada a proteína *PfHRP2*, procedeu-se à avaliação da sua pureza através de um gel SDS-PAGE a 10%, como se pode observar na Figura 4.7.



**Figura 4. 7**– Gel de SDS-PAGE a 10%. O gel correu durante 70 min a 150 V. À esquerda encontram-se os marcadores de peso molecular (valores em kDa) e à direita observa-se a banda correspondente à proteína *PfHRP2*.

Através do gel de SDS-PAGE é possível observar uma banda a aproximadamente 50 kDa, que corresponde ao peso molecular da proteína de interesse [17]. Uma vez comprovada a pureza da proteína foi então calculada a concentração da mesma através do método do ácido bicinonínico (BCA). A reta de calibração encontra-se na Figura 0.3 do anexo B1. Pela reta de calibração são obtidos

Desenvolvimento de um teste de diagnóstico rápido para a deteção de malária em amostras clínicas

valores de concentração da proteína em estudo (ver segunda coluna da Tabela 4.3). Na terceira coluna da Tabela encontram-se os valores das concentrações corrigidos para o volume. Por fim recorrendo à média das concentrações, determinou-se a concentração da proteína PfHRP2, 1,51 mg.mL<sup>-1</sup>.

**Tabela 4. 3** - Concentração da proteína PfHRP2 obtida através do método do BCA.

Amostra		
Volume da amostra (µL)	Concentração (mg.mL <sup>-1</sup> )	Concentração (mg.mL <sup>-1</sup> )
2	3,16	1,67
2	3,52	
5	7,41	1,54
5	7,99	
10	14,30	1,46
10	14,99	
15	20,58	1,36
15	20,24	
<b>Média das concentrações</b>		<b>1,51</b>

#### 4.7 Ensaio imunocromatográfico em papel de filtro

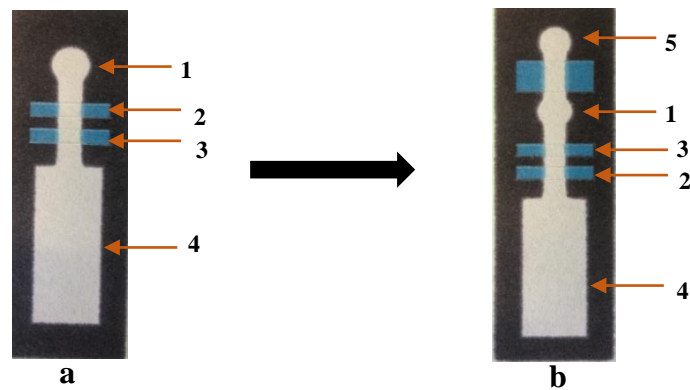
De acordo com Bruno Viegas et al. [47] o aquecimento do papel após a impressão durante 2 minutos a 140 °C é o tempo e a temperatura suficientes para que ocorra a difusão da cera verticalmente ao longo do papel.

Inicialmente o TDR era constituído pela zona de aplicação dos bionanoconjugados, a linha de controlo e de teste e uma zona de lavagem (Figura 4.8a).

Para a aplicação de culturas não infetadas e infetadas com o parasita da malária foi essencial acrescentar ao formato do teste uma zona para a deposição das mesmas, embora esta zona do teste tenha sido modificada ao longo do decorrer do projeto, tal está descrito no ponto 3.6.1 do procedimento experimental.

O TDR necessitou de melhorias ao nível do canal por onde migram as culturas. Foi necessário aumentar o comprimento do canal e a sua largura, uma vez que as culturas apresentavam dificuldade na migração. A difusão da cera ocorre em todas as direções diminuindo a dimensão dos padrões, fator que foi tido em conta aquando da projeção do teste no programa *adobe illustrator cc*.

Finalmente alcançou-se o pretendido, um teste com a largura e o comprimento do canal ótimos para a migração das culturas até à zona de aplicação dos bionanoconjugados e seguindo para as linhas de teste e controlo, como se pode ver na Figura 4.8b.



**Figura 4.8** – TDR para otimização da linha de controlo e de teste (a). TDR para aplicação de culturas não infetadas e infetadas com o antígeno *PfHRP2* (b). 1 – Zona de aplicação dos BNCs, 2 – Linha de controlo, 3 – Linha de teste, 4 – Zona de lavagem, 5 – Zona de deposição das culturas infetadas/não infetadas

#### 4.7.1 Otimização do volume de bionanoconjugados na sua zona de aplicação

Tal como foi referido no ponto 3.6.3 do procedimento experimental foram utilizadas nanopartículas de ouro funcionalizadas com MUA ou CALNN e conjugadas com o anticorpo anti-*PfHRP2*, em duas razões molares diferentes, 1:10 e 1:25.

Variou-se o volume da solução de bionanoconjugados de 30 a 60  $\mu\text{L}$  e a quantidade que ficou estabelecida para os ensaios foi de 40  $\mu\text{L}$  de solução.

Verificou-se que 40  $\mu\text{L}$  de solução era a quantidade ótima para ocorrer um bom reconhecimento entre os bionanoconjugados e o anti-IgG imobilizado na linha de controlo e o antígeno aplicado na linha de teste. O reconhecimento traduz-se no aparecimento de cor vermelha nas linhas de teste e de controlo.

Utilizando um volume de solução de bionanoconjugados inferior ao volume estabelecido, 40  $\mu\text{L}$ , a linha de teste e de controlo não apresentavam a intensidade de cor desejada. Volumes superiores a este foram considerados em excesso, embora conferissem à linha de controlo uma cor vermelha muito nítida.

É ainda de salientar que este volume de solução de bionanoconjugados é apenas utilizado para a otimização da linha de teste e da linha de controlo. Quando se procedeu à utilização das culturas não infetadas e infetadas o volume da solução de bionanoconjugados foi variado, como apresentado no ponto 3.6.6 do procedimento experimental.

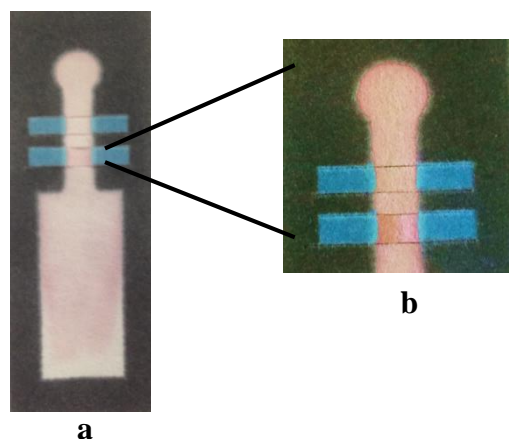
#### 4.7.2 Otimização da linha de teste

Na otimização da linha de teste variou-se a concentração de antígeno recombinante *PfHRP2* de 0,5 a 3,8  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , o volume de antígeno de 2 a 6  $\mu\text{L}$  e o tempo de secagem da solução.

Ao fim de 15 minutos a solução de antigénio aplicada na linha de teste encontra-se completamente seca, sendo este o tempo de secagem estabelecido aquando da realização dos ensaios. Verificou-se que 2,5  $\mu\text{L}$  é o volume ideal a ser aplicado na linha de teste, uma vez que, para volumes superiores ao estabelecido a linha de teste é incapaz de absorver todo o volume sem que se quebre.

Na deteção da linha de teste utilizou-se duas soluções de bionanoconjugados diferentes, AuNP-CALNN-Anticorpo e AuNP-MUA-Anticorpo.

Com a aplicação da solução AuNP-CALNN-Anticorpo observou-se uma cor vermelha na linha de teste, o que mostra a deteção do antigénio pelos bionanoconjugados. Esta deteção ocorreu com a aplicação de uma gota de 2,5  $\mu\text{L}$  de *Pf*HRP2 a 1,5  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , tempo de secagem de 20 minutos e 40  $\mu\text{L}$  de bionanoconjugados. O resultado obtido encontra-se na Figura 4.9. Este resultado apenas se verificou num único teste, não existindo reprodutibilidade do mesmo ao longo da dissertação.



**Figura 4.9** – Deteção da *Pf*HRP2 na linha de teste utilizando bionanoconjugados AuNP-CALNN-Anticorpo (a). Ampliação da linha de teste (b).

Repetiu-se as condições experimentais acima descritas (2,5  $\mu\text{L}$  de *Pf*HRP2 a 1,5  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , tempo de secagem de 15 minutos e 40  $\mu\text{L}$  de bionanoconjugados) com os bionanoconjugados AuNP-MUA-Anticorpo. Nestas condições experimentais não se observou o aparecimento de cor na linha de teste.

Como não se visualizou cor vermelha na linha de teste, utilizando as condições aplicados nos bionanoconjugados AuNP-CALNN-Anticorpo foi novamente variado o tempo de secagem, a concentração e volume de antigénio e o volume de bionanoconjugados.

Variou-se o volume de bionanoconjugados AuNP-MUA-Anticorpo de 30 a 60  $\mu\text{L}$ , o tempo de incubação da gota de antigénio, desde 15 minutos até cerca de 16 horas, a concentração de antigénio de 0,5 a 3,8  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  e o seu volume, de 2 a 6  $\mu\text{L}$ . Após a realização de vários testes nunca se observou cor vermelha na linha de teste, nem mesmo com a concentração mais elevada de antigénio, 3,8  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

O facto de não ocorrer deteção na linha de teste por parte do antigénio *Pf*HRP2 e o anticorpo anti-*Pf*HRP2 conjugado com as nanopartículas de ouro poderia de algum modo advir da não formação do bionanoconjugado.

Desenvolvimento de um teste de diagnóstico rápido para a detecção de malária em amostras clínicas

Contudo tal não se verificou, uma vez que, após a formação dos bionanoconjugados ao longo do trabalho experimental foram traçados os espectros de UV-Visível (ver Figura 4.3, ponto 4.3). Os espectros revelaram um deslocamento da banda LSPR para comprimentos de onda superiores aos de uma solução de AuNP funcionalizada que comprova a formação do bionanoconjugado.

Para reforçar esta hipótese, é de ressaltar que a linha de controlo se encontra a funcionar, ocorrendo ligação entre o anti-IgG imobilizado na mesma e o anticorpo anti-*Pf*HRP2 conjugado com as nanopartículas de ouro.

O antígeno à concentração de 3,8 mg.mL<sup>-1</sup> pertencia a uma produção de antígeno recombinante anterior à presente dissertação, como tal pode ter ocorrido alguma desnaturação do mesmo. Ocorrendo desnaturação, o antígeno perde a sua função, uma vez que perde o enrolamento e pode mesmo perder os seus elementos de estrutura secundária.

Relativamente às outras concentrações de antígeno testadas, de 0,5 a 2,6 mg.mL<sup>-1</sup>, provêm de produções recentes, realizadas na presente dissertação. Durante a sua produção e purificação foram seguidos com o máximo de rigor todos os passos do procedimento de modo a garantir a integridade da proteína. Contudo o resultado obtido com a concentração de 1,5 mg.mL<sup>-1</sup> e os bionanoconjugados AuNP-CALNN-Anticorpo não foi reproduzível ao longo de todo o trabalho experimental.

Em estudos futuros podem ser testadas concentrações mais elevadas de *Pf*HRP2 para averiguar se existe detecção na linha de teste. A inexistência de cor na linha de teste pode ser devida ao fato do antígeno se encontrar em baixa concentração.

Outra hipótese a considerar será a especificidade entre o antígeno *Pf*HP2 e o anticorpo anti-*Pf*HRP2. Em estudos anteriores foram realizados ensaios de *Western Blot*, utilizando a detecção direta e indireta para confirmar a ligação específica entre o antígeno e o anticorpo. Os ensaios de detecção indireta por quimiluminescência revelaram que não ocorreu ligação entre o antígeno *Pf*HP2 e o anticorpo anti-*Pf*HRP2 e nos ensaios de detecção direta utilizando bionanoconjugados AuNP-MUA-Anticorpo apenas foi observada uma banda muito pouco nítida a 50 kDa, peso molecular da proteína *Pf*HRP2.

Estes estudos de especificidade revelaram que de fato existe um problema na especificidade entre o anticorpo anti-*Pf*HRP2 e a proteína *Pf*HRP2 e que talvez poderá ser essa a razão pela qual na presente dissertação não se obteve detecção do antígeno na linha de teste na presença dos bionanoconjugados AuN-MUA-Anticorpo.

O fato de se ter obtido um único resultado na detecção da *Pf*HRP2 com a utilização de bionanoconjugados AuNP-CALNN-Anticorpo não ter sido reproduzível poderá estar relacionado com a falta de especificidade.

### 4.7.3 Otimização da linha de controlo

Na otimização da linha de controlo variou-se o tempo de secagem da gota de anti-IgG, de 15 minutos até 16 horas, o volume de anti-IgG de 2 a 6  $\mu\text{L}$  e a sua diluição.

Ao fim de 15 minutos a solução de anti-IgG aplicada na linha de controlo encontra-se completamente seca, sendo este o tempo de secagem estabelecido para todo o trabalho experimental.

Verificou-se que 2,5  $\mu\text{L}$  é o volume ideal a ser aplicado na linha de controlo, uma vez que, para volumes superiores ao estabelecido a linha de controlo é incapaz de absorver todo o volume sem que se quebre.

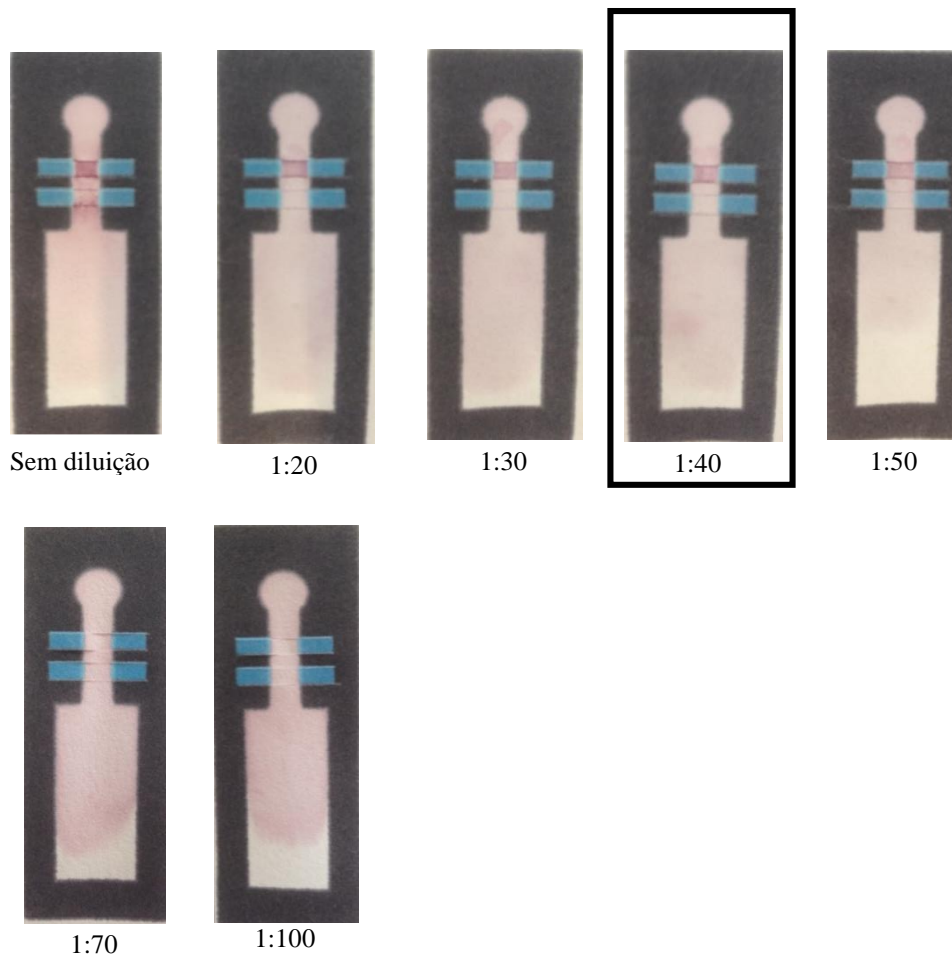
Na detecção da linha de controlo utilizou-se duas soluções de bionanoconjugados diferentes, AuNP-CALNN-Anticorpo e AuNP-MUA-Anticorpo.

Variou-se a diluição da solução de anti-IgG desde sem diluição até 1:100, utilizando os bionanoconjugados AuNP-MUA-Anticorpo e variou-se a diluição da solução de anti-IgG de sem diluição até 1:200 utilizando os bionanoconjugados AuNP-CALNN-Anticorpo.

Relativamente à detecção da linha de controlo, utilizando os bionanoconjugados AuNP-MUA-Anticorpo, a diluição de anti-IgG escolhida para prosseguir com o trabalho experimental foi de 1:40.

Analisando a Figura 4.10, é possível concluir que o teste sem diluição de anti-IgG é o que exibe uma cor vermelha mais intensa. Os testes com diluições inferiores a 1:40, também apresentam uma intensidade de cor na linha de controlo possível para detecção. Porém a utilização de diluições menores representa um gasto mais elevado no fabrico do teste, sem que seja necessário. Utilizando uma diluição de anti-IgG de 1:50 ocorreu detecção na linha de controlo, contudo este resultado não foi reprodutível, assim sendo não foi possível eleger a diluição de 1:50 para prosseguir com os ensaios. Em relação às diluições superiores a 1:50 (1:60 até 1:100) verifica-se que não ocorreu detecção na linha de controlo. Assim sendo, foi escolhida a diluição de 1:40, uma vez que apresenta uma intensidade cor vermelha na linha de controlo adequada para detecção, utilizando o menor volume possível de solução de anti-IgG.

No anexo E1, Figura 0.4 encontram-se os TDR com todas as diluições de anti-IgG para a escolha da diluição ótima, aplicadas na linha de controlo na presença de bionanoconjugados AuNP-MUA-Anticorpo.

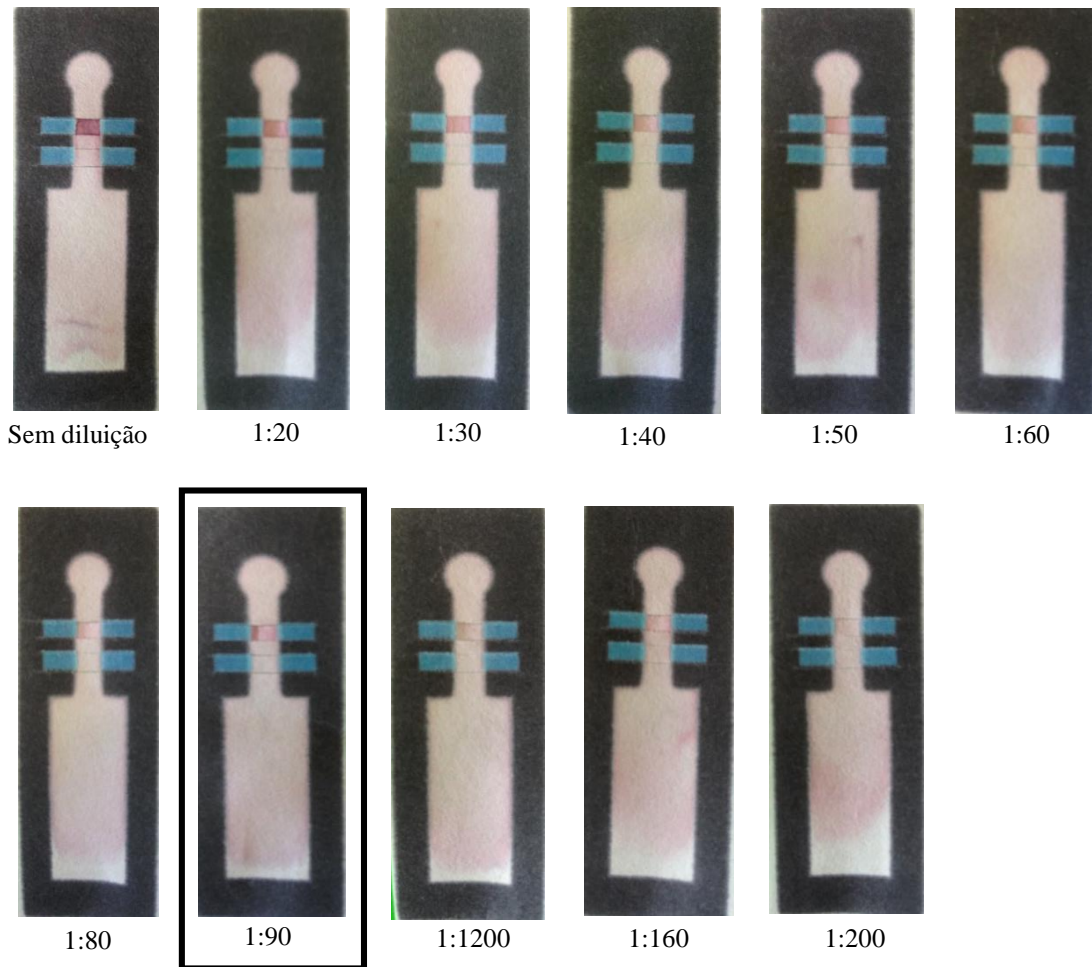


**Figura 4. 10**– Detecção do anti-IgG na linha de controlo utilizando bionanoconjugados AuNP-MUA-Anticorpo.

Relativamente à deteção da linha de controlo, utilizando os bionanoconjugados AuNP-CALNN-Anticorpo, a diluição de anti-IgG escolhida para prosseguir com o trabalho experimental foi de 1:90, tal como ilustra a Figura 4.11.

O teste sem diluição de anti-IgG é novamente o que apresenta uma cor mais intensa na linha de controlo. Os testes com diluições inferiores a 1:90, também apresentam uma intensidade de cor na linha de controlo adequada para deteção. Foi escolhida a diluição de 1:90, uma vez que exibe uma intensidade cor na linha de teste adequada para deteção e utiliza uma concentração menor de solução de anti-IgG. Testes com diluições superiores a 1:90 (1:100 até 1:200) ainda apresentaram cor na linha de controlo, contudo a cor não era nítida para deteção e não se verificou reprodutibilidade.

No anexo E2, Figura 0.5 encontram-se os TDR com todas as diluições de anti-IgG para a escolha da diluição ótima, aplicadas na linha de controlo na presença de bionanoconjugados AuNP-CALNN-Anticorpo.



**Figura 4.11**– Detecção do anticorpo anti-IgG na linha de controlo utilizando bionanoconjugados AuNP-CALNN-Anticorpo.

Utilizando os bionanoconjugados AuNP-CALNN-Anticorpo é possível a deteção da linha de controlo utilizando um menor volume de solução de anti-IgG, quando comparado com os bionanoconjugados AuNP-MUA-Anticorpo. O bionanoconjugado AuNP-CALNN-Anticorpo será o ideal para aplicar no teste, uma vez que permite o reconhecimento entre o anti-IgG imobilizado na linha de controlo e o anticorpo anti-*Pf*HRP2 conjugado com as AuNP utilizando diluições maiores de anti-IgG, o que contribui para tornar o TDR menos dispendioso.

Devido à natureza química do CALNN era exetável que este agente de revestimento demonstrasse melhores resultados do que o MUA. Os dois agentes de funcionalização possuem um tiol na sua constituição, o que favorece a ligação à nanopartícula de ouro, contudo a presença de um grupo amina na proximidade do grupo tiol da cisteína do péptido também favorece a ligação do CALNN à AuNP. Assim sendo, o CALNN apresenta um maior número de características que conferem uma maior estabilidade às nanopartículas de ouro em relação ao MUA. Quanto à ligação do anticorpo ao agente de funcionalização, o CALNN possui duas asparaginas pelas quais se dá a interação com o anticorpo anti-*Pf*HRP2, através do ácido carboxílico, enquanto o MUA apenas contém um ácido carboxílico na sua constituição. O péptido é o melhor candidato para a funcionalização da

Desenvolvimento de um teste de diagnóstico rápido para a deteção de malária em amostras clínicas

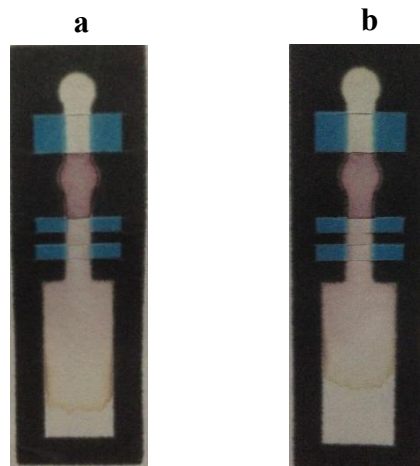
AuNP e para a conjugação com o anticorpo e por conseguinte poderá favorecer a ligação ao anticorpo secundário imobilizado na linha de controlo [38], [39].

#### **4.8 Aplicação de culturas não infetadas e infetadas com o parasita da malária utilizando bionanoconjugados formados com AuNP de 17 nm**

Na tentativa de simular um resultado negativo e positivo para infeção pelo *P. falciparum* utilizaram-se culturas não infetadas ou infetadas com o parasita da malária e foram aplicadas diferentes soluções de bionanoconjugados. As soluções escolhidas foram AuNP funcionalizadas com CALNN e com o anticorpo anti-*Pf*HRP2 numa razão molar de 1:10 e 1:25, AuNP funcionalizadas com MUA e com anticorpo anti-*Pf*HRP2 numa razão molar de 1:10 e 1:25 e AuNP funcionalizadas com CALNN e o agente de ligação EDC/NHS e conjugadas com o anticorpo anti-*Pf*HRP2 numa razão molar de 1:25.

Para a realização do teste foi inicialmente colocado o interruptor (clipe metálico) nas linhas de teste e de controlo e no canal por onde migram as culturas (ver Figura 3.6, ponto 3.6.6) foi aplicado o antígeno e o anticorpo secundário na linha de teste e controlo respetivamente, assim como os bionanoconjugados. Após a secagem das soluções foram retirados os interruptores e aplicada a cultura não infetada ou infetada na zona de aplicação das mesmas. A cultura vai migrar pelo teste, até ao local onde estão imobilizados os bionanoconjugados e posteriormente até às linhas de teste e controlo.

Aplicando 2,5 µL de solução de anti-IgG, na linha de controlo, numa diluição de 1:40 e de 1:90, utilizando bionanoconjugados AuNP-MUA-Anticorpo e AuNP-CALNN-Anticorpo, respetivamente, como anteriormente estabelecido aquando da otimização da linha de controlo, não se observou cor vermelha na linha de controlo aquando da aplicação das culturas, como ilustra a Figura 4.12. Estes resultados mostraram que não ocorre interação entre o anticorpo anti-*Pf*HRP2 conjugado com os bionanoconjugados e o anticorpo secundário imobilizado na linha de controlo. Como tal, houve a necessidade de se estudar várias diluições de anti-IgG e a diluição de 1:20 foi a escolhida para prosseguir com os ensaios, devido à nítida cor vermelha que se observou na linha de controlo e à reprodutibilidade dos ensaios. Utilizando diluições superiores a 1:20 não se visualizou cor na linha de controlo, assim sendo, foi necessário utilizar maiores volumes de anticorpo secundário.



**Figura 4. 12**– Em a) foi depositado 2,5  $\mu\text{L}$  de *PfHRP2* a 1,5  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 2,5  $\mu\text{L}$  de anti-IgG 1:90 e 60  $\mu\text{L}$  de culturas infetadas e 60  $\mu\text{L}$  de BNCs AuNP-CALNN-Anticorpo numa razão de 1:25. Em b) foi depositado 2,5  $\mu\text{L}$  de *PfHRP2* a 1,5  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 2,5  $\mu\text{L}$  de anti-IgG 1:40 e 60  $\mu\text{L}$  de culturas infetadas e 60  $\mu\text{L}$  de BNCs AuNP-MUA-Anticorpo numa razão de 1:25.

Na Figura 4.13 estão representados testes de diagnóstico rápido em diferentes condições aplicando culturas não infetadas e infetadas com o parasita da malária em presença de bionanoconjugados AuNP-CALNN-Anticorpo numa razão molar de 1:25. As condições utilizadas para cada conjunto de ensaios foram repetidas 5 vezes. Nestes ensaios variou-se o volume de solução de bionanoconjugados, a concentração de antígeno e a utilização de culturas concentradas e não concentradas.

Analisando globalmente a Figura 4.13 é observável em todos os TDR que a linha de controlo se encontra a funcionar, isto é, ocorreu interação entre o anticorpo conjugado com as AuNP e o anticorpo secundário imobilizado na mesma.

Na simulação de um resultado negativo, isto é, utilizando culturas não infetadas com o parasita da malária, era de esperar a visualização de cor na linha de teste, uma vez que, iria ocorrer interação entre o antígeno imobilizado na linha de teste e o anticorpo conjugado com as AuNP. Contrariamente ao esperado não se visualizou cor vermelha na linha de teste em nenhum dos TDR. Na Figura 4.13b a linha de teste apresenta cor muito ténue, não satisfatória para diagnóstico.

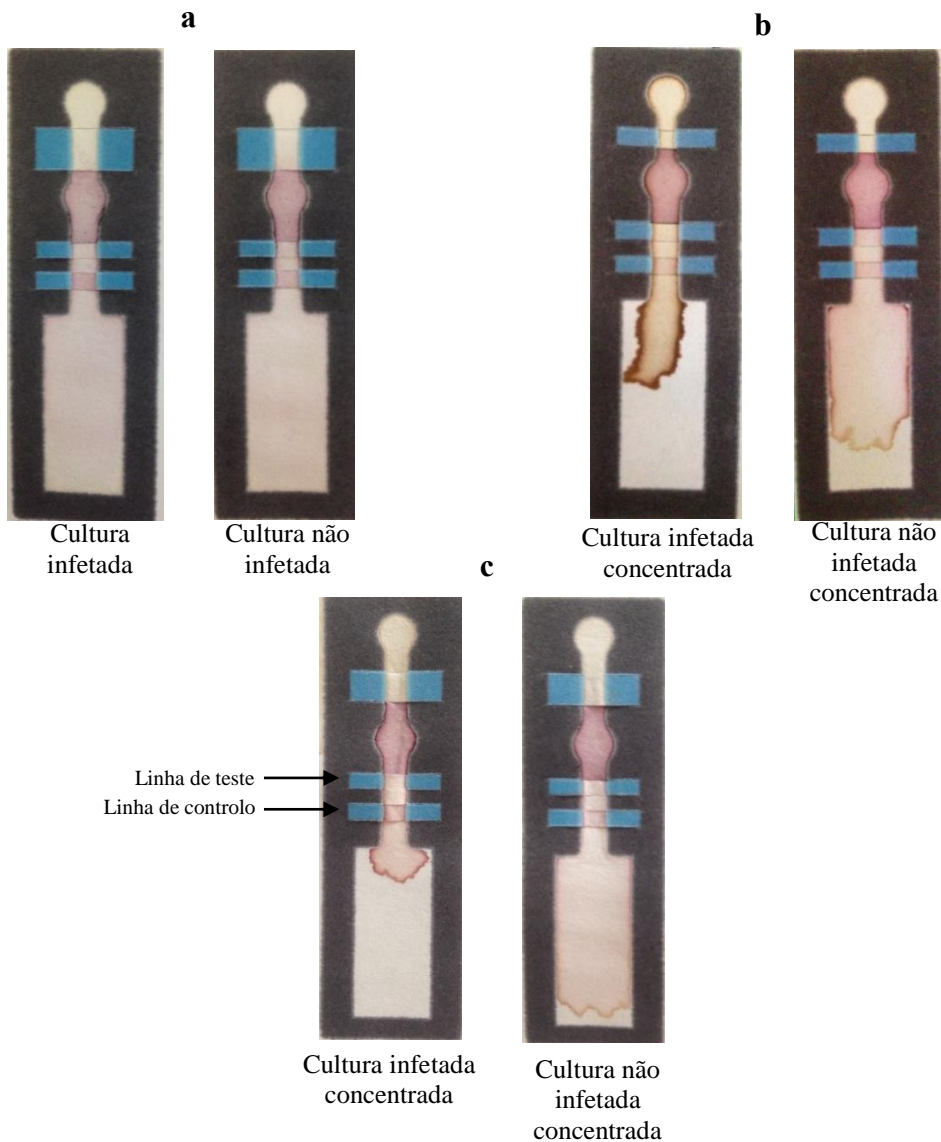
O facto de não existir cor na linha de teste em nenhuma das condições poderá advir do que já foi explicado no ponto 4.7.2. A concentração da *PfHRP2* imobilizada na linha de teste pode não ser a suficiente para que ocorra interação com o anticorpo anti-*PfHRP2*. Outra hipótese a considerar também será a falta de especificidade na ligação entre o anticorpo e o antígeno.

Verificou-se também que a migração não uniforme e contínua das culturas é um aspeto a considerar, uma vez que, após a remoção dos interruptores aquando da aplicação das culturas infetadas ou não infetadas verificou-se uma perda de “elasticidade” por parte das zonas do papel onde se tinha inserido o interruptor, não permitindo que as linhas e o canal criados ficassem permanentemente ao nível dos restantes componentes do teste, impossibilitando assim, a migração uniforme das culturas

Desenvolvimento de um teste de diagnóstico rápido para a detecção de malária em amostras clínicas aplicadas. Por sua vez, esse fator pode influenciar a detecção do antígeno e do anticorpo secundário na medida em que, se o canal por onde as culturas migram se situar a um nível mais elevado, as mesmas ficam concentradas na sua zona de aplicação e grande parte não migra até à zona onde se encontram imobilizados os bionanoconjugados.

Na ausência de infecção existe uma consequência proveniente da migração não uniforme, o volume de cultura que chega à zona onde estão imobilizados os bionanoconjugados poderá não ser o suficiente para que haja uma migração completa dos bionanoconjugados de forma a que ocorra detecção em ambas as linhas, teste e controlo.

Na presença de infecção, existem dois efeitos, a quantidade de antígeno presente na cultura infetada que se vai ligar ao anticorpo anti-*Pf*/HRP2 conjugado com as nanopartículas de ouro pode não ser a quantidade suficiente para que todos os locais de ligação do anticorpo fiquem ocupados com o antígeno. A consequência será o aparecimento de cor vermelha na linha de teste, devido à possível ligação entre o antígeno imobilizado na tira e os bionanoconjugados. Outro fator pode advir do facto de uma parte do volume de cultura ficar retido na sua zona de aplicação e o restante que migra e atinge a zona de imobilização dos bionanoconjugados poderá não ser o suficiente para que ocorra detecção na linha de teste e controlo.

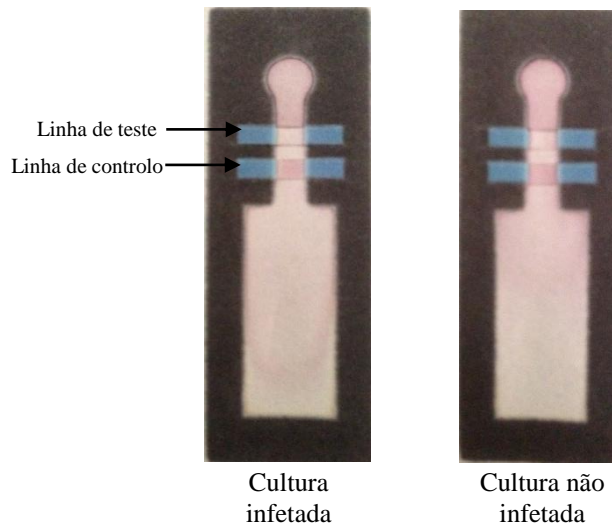


**Figura 4.13** – Simulação de resultados negativos e positivos para infeção por malária utilizando bionanoconjugados AuNP-CALNN-Anticorpo, com uma razão molar de 1:25. Em **a)** foi depositado 2,5  $\mu\text{L}$  de *Pf*HRP2 a 1,5  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 2,5  $\mu\text{L}$  de anti-IgG 1:20 e 60  $\mu\text{L}$  de culturas e de BNCs. Em **b)** foi depositado 2,5  $\mu\text{L}$  de *Pf*HRP2 a 1,5  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 2,5  $\mu\text{L}$  de anti-IgG 1:20 e 60  $\mu\text{L}$  de culturas concentradas e de BNCs. Em **c)** foi depositado 2,5  $\mu\text{L}$  de *Pf*HRP2 a 3,8  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 2,5  $\mu\text{L}$  de anti-IgG 1:20 e 60  $\mu\text{L}$  de culturas concentradas e de BNCs.

Relativamente à Figura 4.14, utilizou-se o TDR sem a zona para a aplicação das culturas, com o intuito de verificar se existia alguma melhoria na deteção ao se depositar diretamente a cultura não infetada ou infetada com o parasita da malária sobre os bionanoconjugados previamente imobilizados, contudo não ocorreu deteção na linha de teste. Como as culturas foram depositadas diretamente sobre os bionanoconjugados e ocorre logo a sua migração ao longo do papel, o tempo que existiu para o reconhecimento pode não ter sido o suficiente para ter ocorrido interação entre os bionanoconjugados e a *Pf*HRP2 (no caso de se tratar da cultura infetada). Contudo, se fosse esse o caso iria-se visualizar num teste positivo o aparecimento de cor na linha de teste, o que não se verificou. O resultado obtido

Desenvolvimento de um teste de diagnóstico rápido para a deteção de malária em amostras clínicas

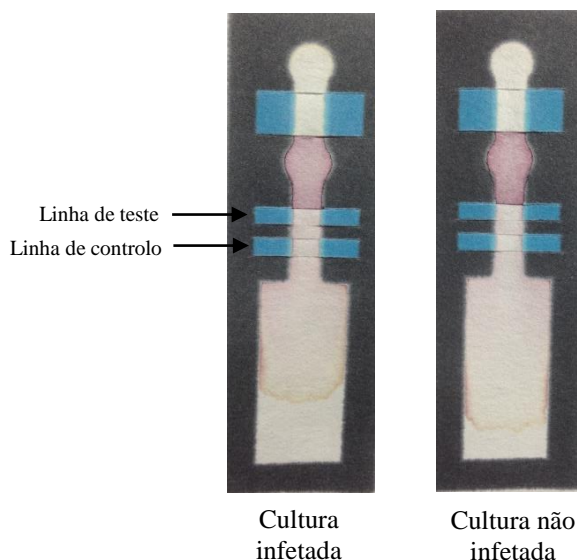
pode ser provavelmente devido à concentração do antigénio e à especificidade entre o antigénio e o anticorpo, uma vez que para o teste negativo seria de esperar coloração vermelha na linha de teste.



**Figura 4.14** – Simulação de resultados negativos e positivos para infeção por malária utilizando bionanoconjugados AuNP-CALNN-Anticorpo, com uma razão molar de 1:25. Aplicou-se no TDR depositado 2,5  $\mu\text{L}$  de *Pf*HRP2 a 1,5  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ , 2,5  $\mu\text{L}$  de anti-IgG 1:20 e 50  $\mu\text{L}$  de culturas e de BNCs.

Com a finalidade de se averiguar se a diminuição da razão de anticorpo conjugado com as AuNP era de algum modo benéfica na deteção, utilizaram-se bionanoconjugados AuNP-CALNN-Anticorpo com uma razão molar de anticorpo de 1:10, em substituição dos bionanoconjugados na razão molar 1:25 (anteriormente apresentados).

Na Figura 4.15 estão representados dois resultados relativos à aplicação de bionanoconjugados AuNP-CALNN-Anticorpo, na razão molar de 1:10, nos quais se aplicou de 2,5  $\mu\text{L}$  de *Pf*HRP2 a 1,5  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ , 2,5  $\mu\text{L}$  de anti-IgG 1:20 e 60  $\mu\text{L}$  de culturas e de bionanoconjugados.



**Figura 4.15** – Simulação de resultados negativos e positivos para infeção por malária utilizando bionanoconjugados AuNP-CALNN-Anticorpo, com uma razão molar de 1:10. Aplicação de 2,5  $\mu\text{L}$  de *PfHRP2* a 1,5  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 2,5  $\mu\text{L}$  de anti-IgG 1:20 e 60  $\mu\text{L}$  de culturas e de BNCs.

Pela análise da Figura 4.15, verifica-se que a linha de controlo e de teste não apresentam cor vermelha. As condições utilizadas para cada conjunto de ensaios foram repetidas 5 vezes, sempre com o mesmo resultado final.

O facto de não ter ocorrido deteção na linha de controlo nem na linha de teste poderá advir da razão molar de anticorpo conjugado com as AuNP ser insuficiente para que ocorresse interação entre os bionanoconjugados e o anticorpo secundário imobilizado na linha de controlo e o antigénio imobilizado na linha teste. Outra agravante tem a ver com, uma parte do volume de cultura ficar retido na sua zona de aplicação e o restante que migra e alcança a zona de imobilização dos bionanoconjugados ser insuficiente para deteção na linha de teste e controlo.

Em relação à linha de teste, não se visualizou cor aquando da simulação de um resultado negativo, pelas razões descritas acima e também possivelmente devido à concentração da *PfHRP2* e à especificidade do anticorpo para com o antigénio, problemática esta que se verificou ao longo de todos os ensaios realizados.

Na Figura 4.16 encontram-se representadas simulações de resultados negativos e positivos, em que se utilizou bionanoconjugados AuNP-MUA-Anticorpo, numa razão molar de 1:25. As condições utilizadas para cada conjunto de ensaios foram repetidas 5 vezes. Os TDR da Figura 4.16a e 4.16b diferem na geometria do mesmo, no volume de solução de bionanoconjugados utilizado e na concentração da *PfHRP2*.

Nos TDR da Figura 4.16a aplicou-se 2,5  $\mu\text{L}$  de *PfHRP2* a 2,6  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  na linha de teste, 2,5  $\mu\text{L}$  de anticorpo secundário da linha de controlo e 60  $\mu\text{L}$  de culturas não infetadas e infetadas com a *PfHRP2* e 60  $\mu\text{L}$  de bionanoconjugados.

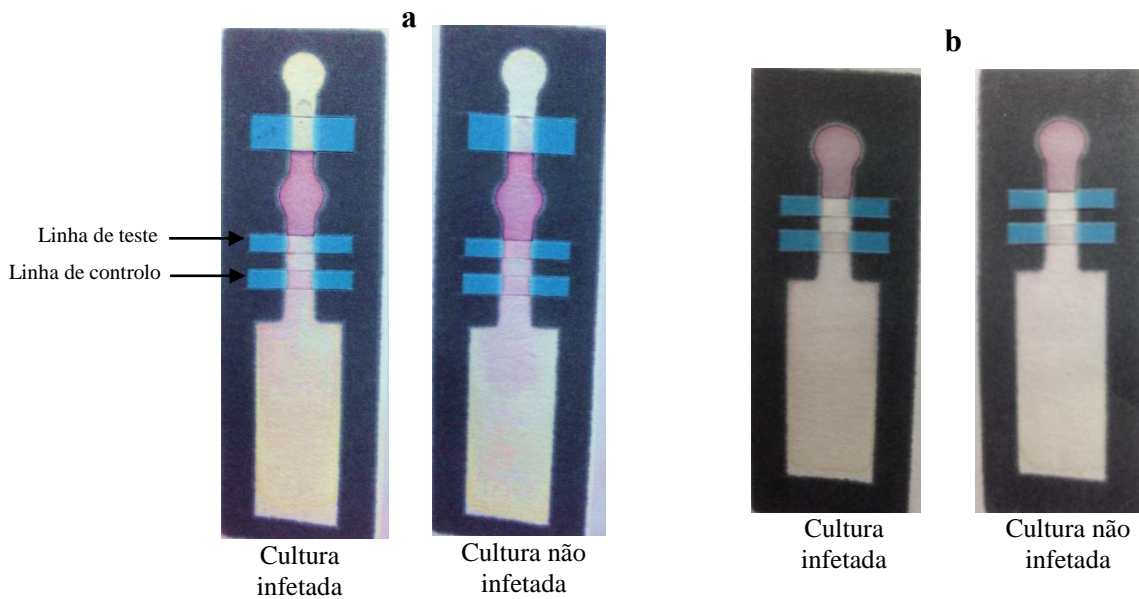
Desenvolvimento de um teste de diagnóstico rápido para a deteção de malária em amostras clínicas

No resultado positivo (Figura 4.16a, cultura infetada com o parasita da malária) utilizou-se culturas infetadas com a *Pf*HRP2 que se vai ligar ao anticorpo conjugado com as nanopartículas de ouro, e como é de esperar que os locais de ligação ao anticorpo fiquem ocupados com o antígeno da cultura não se irá visualizar cor vermelha na linha de teste, que contém imobilizado o antígeno recombinante. Apenas se irá visualizar cor na linha de controlo.

No resultado negativo (Figura 4.16a, cultura não infetada com o parasita da malária) observa-se cor na linha de teste e na linha de controlo, tal como era esperado (princípio teórico), uma vez que foram aplicadas culturas não infetadas com a *Pf*HRP2. Assim ocorreu interação entre os bionanoconjugados e o antígeno recombinante imobilizado na linha de teste e entre os bionanoconjugados e o anticorpo secundário imobilizado na linha de controlo.

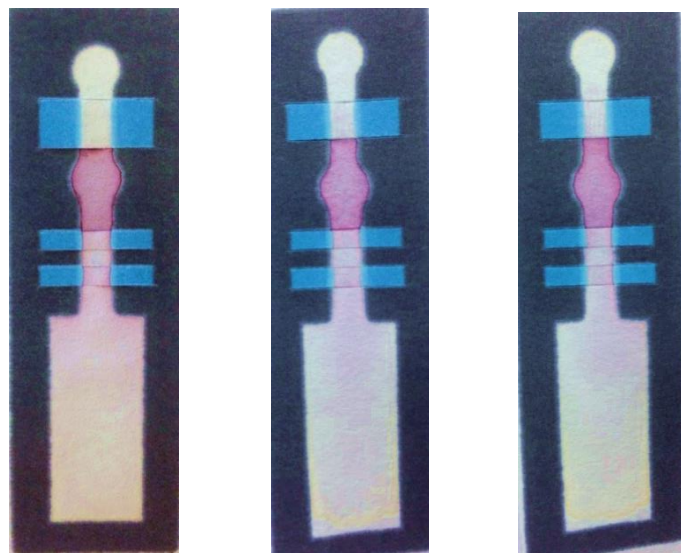
Contudo, ao comparar a linha de teste dos dois TDR da Figura 4.16a, verifica-se que a linha de teste em que foram aplicadas as culturas infetadas apresenta uma cor vermelha que não é tao nítida comparativamente com a linha de teste do TDR em que foram aplicadas as culturas não infetadas. Esta fraca coloração da linha de teste de um resultado positivo poderá ser devido ao facto de nem todos os locais do anticorpo conjugado com as AuNP estarem ocupados com a *Pf*HRP2 existente na cultura infetada.

Relativamente à Figura 4.16b, aplicou-se 2,5  $\mu\text{L}$  de *Pf*HRP2 a 1,5  $\text{mg.mL}^{-1}$  na linha de teste, 2,5  $\mu\text{L}$  de anticorpo secundário da linha de controlo e 50  $\mu\text{L}$  de culturas não infetadas e infetadas com a *Pf*HRP2 e 50  $\mu\text{L}$  de bionanoconjugados. É possível visualizar que os resultados não correspondem ao esperado, sendo que apenas na linha de controlo é que se observa cor vermelha em ambos os testes. Aplicando cultura infetada com o parasita da malária obteve-se o resultado esperado, uma vez que apenas se visualiza cor vermelha na linha de controlo. Quanto ao TDR que corresponde a um resultado negativo pode não ter ocorrido deteção na linha de teste entre o antígeno *Pf*HRP2 e os bionanoconjugados por se ter aplicado a solução de cultura não infetada diretamente sobre os bionanoconjugados imobilizados. É também de considerar os fatores referidos anteriormente, a especificidade entre o antígeno e o anticorpo e a concentração a que o antígeno se encontra.



**Figura 4.16** – Simulação de resultados negativos e positivos para infeção por malária utilizando bionanoconjugados AuNP-MUA-Anticorpo, com uma razão molar de 1:25. Em **a)** foi depositado 2,5  $\mu\text{L}$  de *PfHRP2* a 2,6  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ , 2,5  $\mu\text{L}$  de anti-IgG 1:20 e 60  $\mu\text{L}$  de culturas e de BNCs. Em **b)** foi depositado 2,5  $\mu\text{L}$  de *PfHRP2* a 1,5  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ , 2,5  $\mu\text{L}$  de anti-IgG 1:20 e 50  $\mu\text{L}$  de culturas e de BNCs.

Na Figura 4.17 encontram-se representados simulações de resultados negativos. Aplicando 2,5  $\mu\text{L}$  de *PfHRP2* a 2,6  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ , 2,5  $\mu\text{L}$  de anti-IgG 1:20 e 60  $\mu\text{L}$  de culturas não infetadas e infetadas com o parasita da malária e de bionanoconjugados obteve-se em 3 testes, o resultado esperado, ou seja tanto a linha de controlo como a linha de teste apresentam cor vermelha.



**Figura 4.17**– Conjunto de TDR em que se obteve resultados negativos para infeção por malária utilizando bionanoconjugados AuNP-MUA-Anticorpo com uma razão molar de 1:25, 2,5  $\mu\text{L}$  de *PfHRP2* a 2,6  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ , 2,5  $\mu\text{L}$  de anti-IgG 1:20 e 60  $\mu\text{L}$  de culturas e de BNCs.

Desenvolvimento de um teste de diagnóstico rápido para a detecção de malária em amostras clínicas

Os TDR baseados em bionanoconjugados AuNP-MUA-Anticorpo apresentaram os resultados esperados para um diagnóstico negativo em 3 testes, enquanto nos TDR baseados em bionanoconjugados AuNP-CALNN-Anticorpo nunca foi visível coloração vermelha na linha de teste nem na linha de controlo, utilizando em ambos os bionanoconjugados uma razão molar de anticorpo de 1:25.

Era de esperar que os TDR baseados em bionanoconjugados AuNP-CALNN-Anticorpo apresentassem os melhores resultados, uma vez que, como já foi referido anteriormente, a conjugação com as AuNP e com os anticorpos é favorecida em presença do péptido CALNN, comparativamente com o MUA. Ambas as moléculas de revestimento possuem um grupo tiol que promove a ligação às AuNP, porém o CALNN possui um grupo amina na vizinhança do grupo tiol que também vai auxiliar a ligação do mesmo às AuNP. Em relação à ligação ao anticorpo, o CALNN é constituído por superfícies favoráveis na ligação de proteína, por ser também do tipo proteico, isto é, constituído por vários aminoácidos.

Porém, os resultados apresentados pelos bionanoconjugados AuNP-MUA-Anticorpo não são reprodutíveis uma vez que apenas se verificaram em 3 testes dos 5 efetuados. Tal como referido anteriormente, a incoerência de resultados pode dever-se à falta de especificidade da ligação entre a proteína *PfHRP2* e o anticorpo anti-*PfHRP2* e ainda à reduzida concentração da proteína *PfHRP2* nas culturas de sangue infetado.

Uma vez que foram realizados ensaios com bionanoconjugados AuNP-CALNN-Anticorpo, a uma razão molar de anticorpo de 1:10, para existir um termo de comparação realizou-se também os mesmos ensaios com bionanoconjugados AuNP-MUA-Anticorpo, na razão molar de 1:10, tendo como objetivo averiguar se a diminuição da quantidade de anticorpos conjugados com as nanopartículas era benéfica na deteção.

Na Figura 4.18a foi aplicado 2,5  $\mu\text{L}$  de *PfHRP2* a 1,5  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ , 2,5  $\mu\text{L}$  de anti-IgG 1:20 e 60  $\mu\text{L}$  de culturas infetadas e não infetadas concentradas e de bionanoconjugados. Na Figura 7b foi aplicado 2,5  $\mu\text{L}$  de *PfHRP2* a 1,5  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ , 2,5  $\mu\text{L}$  de anti-IgG 1:20 e 50  $\mu\text{L}$  de culturas e de bionanoconjugados. Testou-se culturas concentradas e sem estarem concentradas com o intuito de avaliar se as culturas concentradas eram uma mais-valia na deteção. As condições utilizadas para cada conjunto de ensaios foram repetidas 5 vezes.

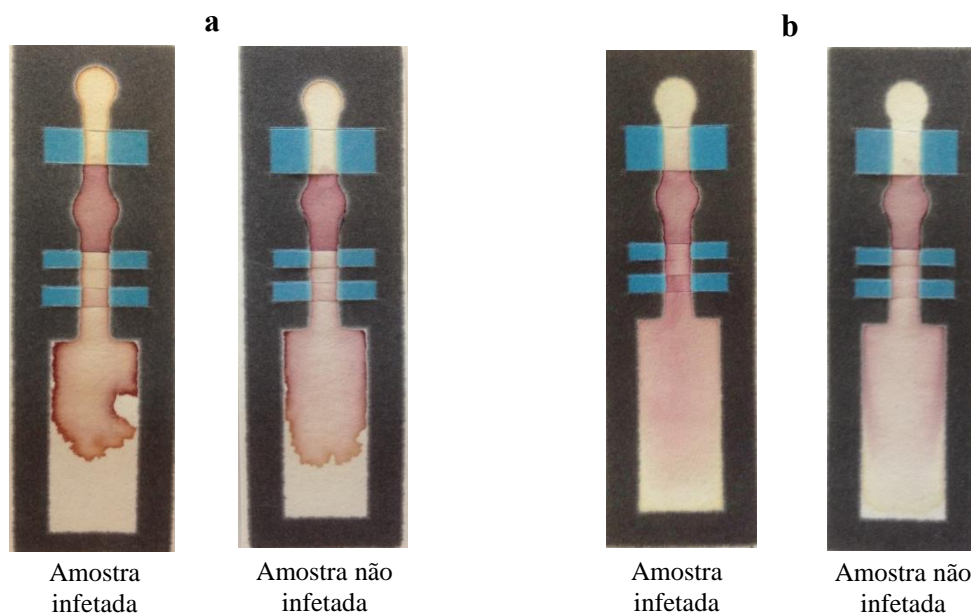
Analisando a Figura 4.18a, o TDR que representa um resultado positivo (cultura infetada com o parasita da malária) apresenta uma cor ténue na linha de controlo e não apresenta cor na linha de teste, tal como era esperado. A coloração amarela que as culturas concentradas apresentam vai influenciar o processo de deteção na linha de controlo, uma vez que, a cor vermelha característica na linha de controlo vai ficar mascarada pela coloração das culturas, tornando-a menos perceptível. Em relação ao resultado negativo (cultura não infetada com o parasita da malária) não se observa cor nas linhas de

Desenvolvimento de um teste de diagnóstico rápido para a detecção de malária em amostras clínicas

teste e de controlo. O mesmo acontece na Figura 4.18b, existe deteção por parte da linha de controlo no teste positivo, contudo não ocorre deteção nas linhas de controlo e de teste no teste negativo.

Conclui-se que, conjugando o anticorpo anti-*Pf*HRP2 na razão molar de 1:10 existe reconhecimento entre o mesmo e o anticorpo secundário, contudo a cor que se visualiza na linha de controlo não é apropriada para diagnosticar a doença, uma vez que no resultado positivo a mesma foi afetada pela cor das culturas e no resultado negativo a linha de controlo apresenta uma mancha vermelha e não uma cor nítida como já se observou anteriormente noutros TDR.

Comparando os resultados apresentados pelos bionanoconjugados AuNP-CALNN-Anticorpo e AuNP-MUA-Anticorpo a uma razão molar de 1:10, verifica-se que ocorre uma fraca deteção na linha de controlo utilizando os bionanoconjugados AuNP-MUA-Anticorpo, contrariamente aos bionanoconjugados AuNP-CALNN-Anticorpo, que nunca se visualizou cor na linha de teste nem na linha de controlo. Contudo, na linha de teste nunca se visualizou cor na simulação de um resultado negativo para malária, independentemente do tipo de bionanoconjugados usados.



**Figura 4.18** – Simulação de resultados negativos e positivos para infeção por malária utilizando bionanoconjugados AuNP-MUA-Anticorpo, com uma razão molar de 1:10. Em **a)** foi depositado 2,5  $\mu\text{L}$  de *Pf*HRP2 a 1,5  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ , 2,5  $\mu\text{L}$  de anti-IgG 1:20 e 60  $\mu\text{L}$  de culturas concentradas e de BNCs. Em **b)** foi depositado 2,5  $\mu\text{L}$  de *Pf*HRP2 a 1,5  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ , 2,5  $\mu\text{L}$  de anti-IgG 1:20 e 50  $\mu\text{L}$  de culturas e de BNCs.

Na Figura 4.19 encontram-se representados TDR baseados em bionanoconjugados AuNP-CALNN-(EDC/NHS)-Anticorpo. As condições utilizadas na Figura 4.19a foi a aplicação de 2,5  $\mu\text{L}$  de *Pf*HRP2 a 1,5  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ , 2,5  $\mu\text{L}$  de anti-IgG 1:20 e 60  $\mu\text{L}$  de culturas infetadas e não infetadas e de bionanoconjugados. As condições da Figura 4.19b foram as mesmas utilizadas na Figura 4.19a, com

Desenvolvimento de um teste de diagnóstico rápido para a deteção de malária em amostras clínicas

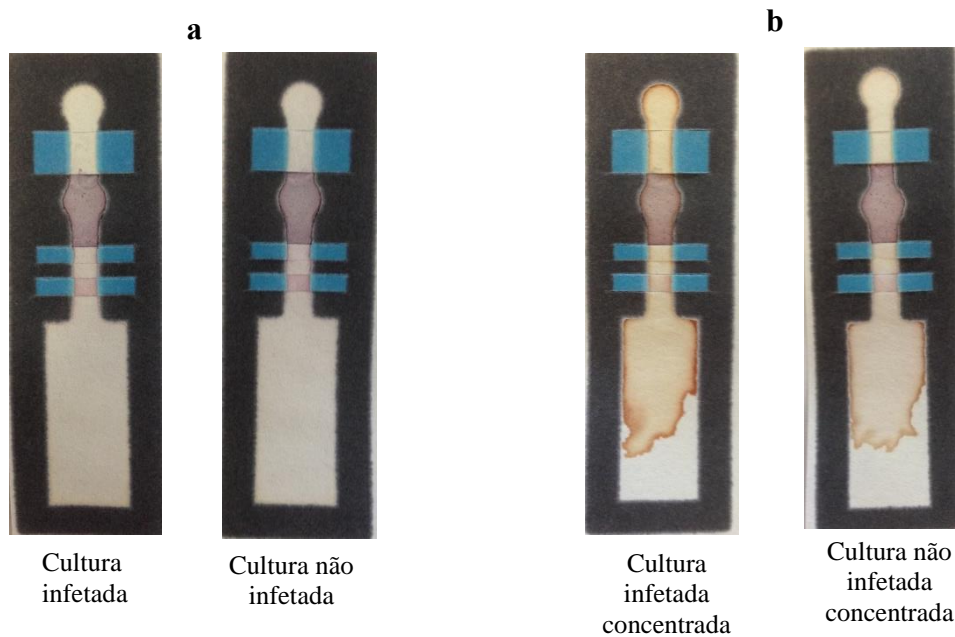
exceção das culturas, que foram concentradas. As condições utilizadas para cada conjunto de ensaios foram repetidas 5 vezes.

Comparando os dois resultados é possível concluir que o uso de culturas concentradas foi, mais uma vez desfavorável na deteção do anticorpo secundário imobilizado na linha de controlo. Devido à coloração amarela proveniente das culturas concentradas, o processo de deteção na linha de controlo vai ser afetado, na medida em que essa cor vai mascarar a coloração vermelha característica da linha de controlo, tornando-a menos perceptível. Relativamente à Figura 4.19a, no resultado positivo ocorreu reconhecimento entre o anticorpo secundário e o anticorpo anti-*PfHRP2*, onde se visualiza cor vermelha nítida na linha de controlo, enquanto no teste negativo o mesmo não acontece, observa-se apenas uma cor muito ténue devido ao facto de as culturas estarem concentradas.

Quanto à deteção da linha de teste, verificou-se mais uma vez, para a Figura 4.19a e 4.19b, que no resultado negativo não se visualizou cor na linha de teste. Como já foi referido em cima pode-se tratar do problema de concentração da proteína *PfHRP2* ou da especificidade de ligação entre a proteína *PfHRP2* e o anticorpo anti-*PfHRP2*.

Utilizou-se o agente de reticulação EDC/NHS conjugado com as nanopartículas de ouro, com vista a melhorar a deteção. As carbodimidias como o EDC catalisam a formação de ligações amida entre grupos carboxilos e grupos aminas e é solúvel em água. Por outro lado, o NHS é utilizado para aumentar a estabilidade de intermediários em reações de acoplamento pela formação grupos funcionais éster com carboxilatos [48], [49].

A conjugação das AuNP com o agente de reticulação EDC/NHS conduziu a uma alteração de cor da solução de bionanoconjugados de vermelho para roxo, indicando agregação da solução. A utilização do agente de reticulação não apresentou vantagem para a promoção da ligação do anticorpo anti-*PfHRP2* e o antigénio *PfHRP2*.



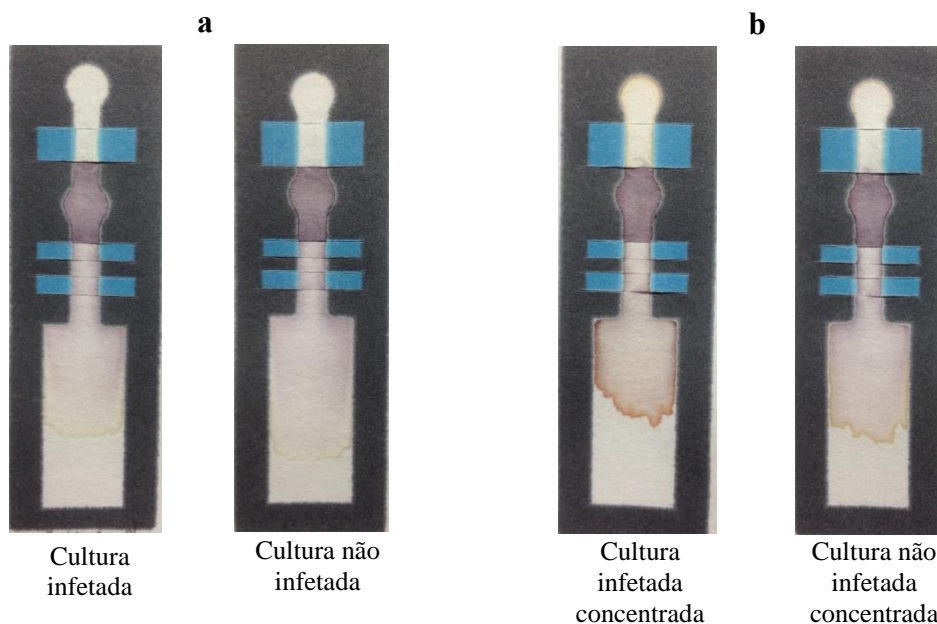
**Figura 4.19** – Simulação de resultados negativos e positivos para infecção por malária utilizando bionanoconjugados AuNP-CALNN-(EDC/NHS)-Anticorpo, com uma razão molar de 1:25. Em **a**) foi depositado 2,5  $\mu\text{L}$  de *PfHRP2* a 1,5  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ , 2,5  $\mu\text{L}$  de anti-IgG 1:20 e 60  $\mu\text{L}$  de culturas e de BNCs. Em **b**) foi depositado 2,5  $\mu\text{L}$  de *PfHRP2* a 1,5  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ , 2,5  $\mu\text{L}$  de anti-IgG 1:20 e 60  $\mu\text{L}$  de culturas concentradas e de BNCs.

#### 4.9 Aplicação de culturas não infetadas e infetadas com o parasita da malária utilizando bionanoconjugados formados com AuNP de 52 nm

Foram também utilizados bionanoconjugados formados com AuNP, com 52 nm de diâmetro. A utilização destas AuNP de maior diâmetro relativamente às usadas anteriormente (com cerca de 15 nm de diâmetro) poderá permitir um aumento da sensibilidade do TDR, uma vez que possuem uma maior área superficial, implicando a possibilidade de aumentar o número de anticorpos conjugados por cada nanopartícula. Também apresentam como vantagem possuírem uma intensidade de cor que pode ser até 4x superior à intensidade de cor das nanopartículas de ouro de 15 nm de diâmetro (anteriormente aqui apresentadas), o que representa uma enorme vantagem na detecção da linha de teste e de controlo.

A Figura 4.20 ilustra a simulação de resultados negativos e positivos de malária causada pelo *P. falciparum* utilizando as AuNPs de maior diâmetro na formação dos bionanoconjugados. A razão molar de MUA estabelecida para a funcionalização com as AuNP foi 1:40.000 e de anticorpo 1:125, razões de conjugação que foram estabelecidas anteriormente no laboratório [50].

Nos TDR apresentados na Figura 4.20a aplicou-se 2,5  $\mu\text{L}$  de *PfHRP2* a 0,95  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ , 2,5  $\mu\text{L}$  de anti-IgG 1:20 e 50  $\mu\text{L}$  de culturas e de bionanoconjugados. Na Figura 4.20b as condições foram exatamente as mesmas, a diferença reside no uso de culturas concentradas. As condições utilizadas para cada conjunto de ensaios foram repetidas 5 vezes.



**Figura 4.20** – Simulação de resultados negativos e positivos para infecção por malária utilizando bionanoconjugados AuNP-MUA-Anticorpo. Em **a**) foi depositado 2,5  $\mu\text{L}$  de *Pf*HRP2 a 0,95  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 2,5  $\mu\text{L}$  de anti-IgG 1:20 e 50  $\mu\text{L}$  de culturas e de BNCs. Em **b**) foi depositado 2,5  $\mu\text{L}$  de *Pf*HRP2 a 0,95  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 2,5  $\mu\text{L}$  de anti-IgG 1:20 e 50  $\mu\text{L}$  de culturas concentradas e de BNCs.

Analisando a Figura 4.20, é visível que não ocorreu interação entre o anticorpo anti-*Pf*HRP2 conjugado com as AuNP e o anticorpo secundário imobilizado na linha de controle, nem com o antígeno imobilizado na linha de teste. A ausência dessa interação é comprovada pela ausência de cor na linha de controle e na linha de teste.

A *Pf*HRP2 utilizada nas linhas de teste destes ensaios encontrava-se a 0,95  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , concentração esta que poderá ser insuficiente para que ocorra interação entre a mesma e o bionanoconjugado. Será necessário a repetição dos mesmos ensaios com uma concentração de proteína superior. Mais uma vez, a fraca especificidade entre o antígeno *Pf*HRP2 imobilizado na linha de teste e o anticorpo anti-*Pf*HRP2 poderá ser um fator determinante para que não tenha ocorrido detecção na linha de teste, no caso de se tratar de um resultado negativo.

Relativamente à linha de controle, nunca se observou cor na mesma ao longo de todas as repetições. Tal ocorrência poderá estar relacionada com a razão molar de anticorpo conjugado com as AuNP não ter sido suficiente para que ocorresse interação com o anticorpo secundário imobilizado na linha de controle. A diluição do anticorpo secundário utilizada no TDR, 1:20, também pode ser um fator a considerar. A utilização de uma diluição menor poderá ser um benefício para o teste, contudo devido a limitações de tempo não foi possível realizar esse estudo.

A retenção das culturas não infetadas e infetadas com a *Pf*HRP2 na sua zona de aplicação, causada pela elevação das linhas de teste e controle e ainda por parte do canal por onde as mesmas migram, conduz a uma migração não uniforme, o que influencia a detecção na linha de teste e de controle.

#### 4.10 Ensaio imunocromatográfico em papel de fotocópia

Para além do papel *Whatman* nº 1 também se recorreu ao papel de fotocópia como substrato alternativo para o teste de diagnóstico rápido.

O papel de fotocópia é um substrato de mais baixo custo quando comparado com o papel *Whatman* nº1 [28], [51] sendo essa uma grande vantagem no que diz respeito ao desenvolvimento do TDR, uma vez que, quanto menos dispendioso for o teste seja nos reagentes utilizados, seja no material que o constitui, mais apelativo se torna para futura comercialização.

Uma outra vantagem é a cor que o papel de fotocópia apresenta, uma vez que é um papel mais branco quando comparado com o papel *Whatman* nº1. Na sua constituição apresenta cloro e cálcio, dois elementos que são comumente utilizados no processo de branqueamento [52]. O facto de o papel de fotocópia ser mais branco é um benefício para o teste, no sentido que permite uma melhor visualização da cor vermelha da solução de bionanoconjugados nas linhas de teste e de controlo.

O procedimento de difusão da cera usado para o papel de fotocópia foi o mesmo utilizado para o papel *Whatman* nº1, tal como apresentado no ponto 3.6 do procedimento experimental.

Pretendeu-se verificar se o papel de fotocópia daria um bom substrato para o desenvolvimento do TDR.

Ao depositar-se 40  $\mu$ L da solução de bionanoconjugados na zona de aplicação dos mesmos verificou-se que a gota não foi absorvida pelo papel de filtro, não ocorrendo a migração da solução de bionanoconjugados ao longo do teste (Figura 4.21).



**Figura 4.21**– Teste de diagnóstico rápido utilizando papel de fotocópia como substrato.

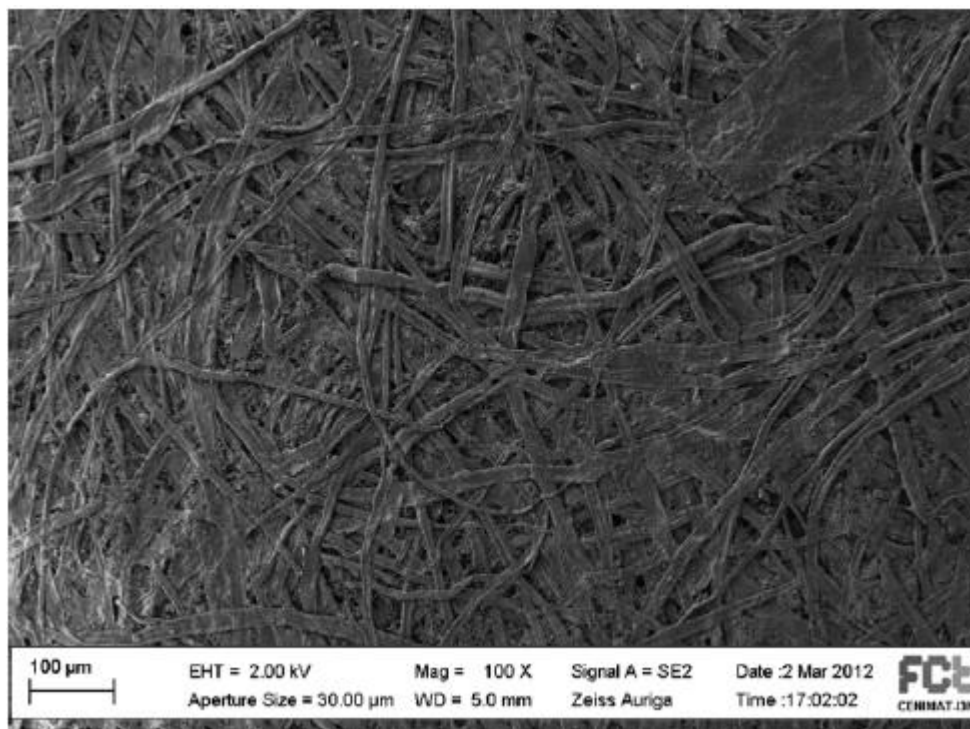
O papel de fotocópia não permite a migração da solução de bionanoconjugados devido à sua baixa porosidade. A porosidade do papel advém dos espaços entre as fibras e dos lumens das fibras que não colapsaram no processo de fabrico do papel e da porosidade intrínseca das paredes das fibras [53].

O papel de fotocópia apresenta uma porosidade de 49%, inferior à do papel *Whatman* nº1 com uma porosidade de 68%. [28]

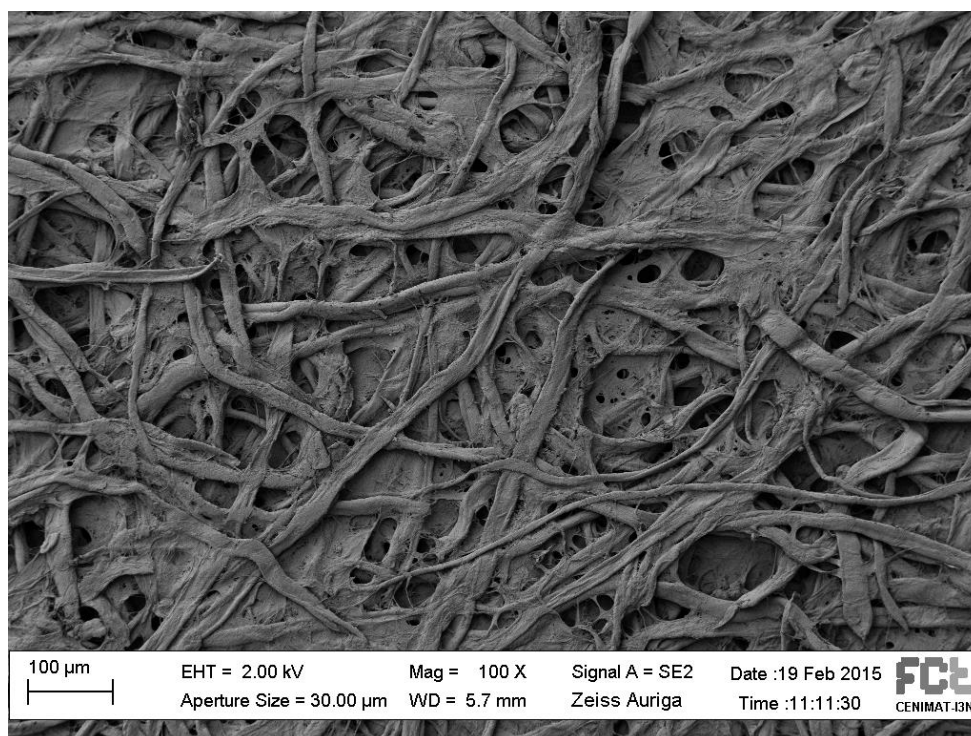
Na Figura 4.22 e 4.23 estão representadas imagens de SEM do papel *Whatman* nº1 e do papel de fotocópia. As fibras do papel de fotocópia são mais achatadas, comparativamente com as fibras do papel *Whatman* nº1 que possuem uma forma mais cilíndrica, forma esta que contribui para o aumento da porosidade e da espessura do papel. É possível visualizar nas imagens de SEM das Figuras 4.22 e 4.23 que o papel *Whatman* nº1 é mais poroso, ao contrário do papel de fotocópia, que apresenta uma estrutura mais compacta.

Apesar de o papel de fotocópia permitir um melhor contraste de colorações devido à sua cor branca, apresenta uma ineficiente capacidade de absorção e de condução das soluções por capilaridade, quando comparado com o papel *Whatman* nº1. Estes dois tipos de papel apresentam propriedades de polaridade completamente distintas. O papel *Whatman* nº1 é um substrato hidrofílico, apresentando um menor ângulo de contato de uma gota de água depositada à superfície quando comparado com o papel de fotocópia, que como é um substrato hidrofóbico apresenta um maior ângulo de contato [53].

Em suma, o papel de fotocópia não é um substrato adequado para o desenvolvimento do TDR uma vez que não ocorre a condução da solução de bionanoconjugados, passo essencial para o funcionamento do teste.



**Figura 4.22** – Imagem de SEM do papel de fotocópia com ampliação de 100 x. Retirado de [53]



**Figura 4.23** – Imagem de SEM do papel *Whatman* n°1 com ampliação de 100 x. Análise de SEM efetuada pela pós-doutorada Daniela Gomes do CENIMAT, I3N.



## 5 Conclusões e Perspetivas Futuras

### 5.1 Conclusões

Na presente dissertação foi possível o desenvolvimento de um teste de diagnóstico rápido para deteção do antigénio de malária *PfHRP2* em culturas de sangue infetadas com o parasita da malária.

Inicialmente, para a formação dos bionanoconjugados foi necessário sintetizar nanopartículas de ouro esféricas. O método de Turkevich utilizado na síntese das mesmas revelou ser bastante reprodutível, na medida em que, ao longo do trabalho experimental das várias sínteses realizadas resultaram nanopartículas esféricas com diâmetros semelhantes na gama de 15-20 nm.

Formaram-se bionanoconjugados AuNP-MUA-Anticorpo numa razão molar de 1:5000:25 e AuNP-CALNN-Anticorpo numa razão molar de 1:1000:25 e a sua formação foi confirmada por espectrofotometria de UV-Visível, onde foi possível observar um deslocamento do máximo da banda de LSPR dos bionanoconjugados cerca de 2-3 nm quando comparado com o máximo de absorvância de AuNP-Citrato.

Nos estudos de estabilidade coloidal variando a força iónica, a solução AuNP-CALNN foi a que demonstrou os melhores resultados, sendo o CALNN o agente de revestimento mais resistente a variações de força iónica, em comparação com o MUA, citrato de sódio e o bionanoconjugado. Em contrapartida, o bionanoconjugado AuNP-MUA-Anticorpo foi a espécie menos resistente à variação da força iónica do meio, devido à ausência do passo de bloqueio com a BSA e aos passos de lavagem.

Em relação aos estudos de estabilidade em que foi variado o pH do meio verificou-se que as nanopartículas de ouro revestidas com o citrato de sódio provenientes da síntese atingiram o ponto de agregação ao valor do pKa do citrato de sódio, no entanto o mesmo não se verificou para as AuNP-MUA e AuNP-CALNN, uma vez que o seu ponto de agregação ocorreu a um valor de pH inferior ao valor do pKa dos agentes de revestimento, MUA e CALNN.

Relativamente à produção e purificação da proteína *PfHRP2*, os passos para a obtenção da mesma foram efetuados com sucesso. Após a purificação da proteína foi realizado um gel de SDS-PAGE, de modo a avaliar a sua pureza e visualizou-se uma banda a aproximadamente 50 kDa, que corresponde ao peso molecular da proteína de interesse. Quanto à quantificação da *PfHRP2*, recorreu-se ao método de BCA para o cálculo da concentração da mesma, obtendo-se 1,51 mg.mL<sup>-1</sup>.

Para o desenvolvimento do TDR foi estabelecido o volume ótimo de solução de bionanoconjugados (15 nM) de 40 µL e o volume de antigénio *PfHRP2* (1,5 mg.mL<sup>-1</sup>) e de anti-IgG (solução mãe 11 mg.mL<sup>-1</sup>) a depositar na linha de controlo e de teste, respetivamente, foi de 2,5 µL.

Relativamente à linha de teste, obteve-se deteção do antigénio pelo bionanoconjugado AuNP-CALNN-Anticorpo ao aplicar 2,5 µL de *PfHRP2* a 1,5 mg.mL<sup>-1</sup>, 2,5 µL de anti-IgG a 11 mg.mL<sup>-1</sup> e 40 µL e bionanoconjugados. Não se obteve deteção do antigénio imobilizado na linha de teste pelo bionanoconjugado AuNP-MUA-Anticorpo.

Desenvolvimento de um teste de diagnóstico rápido para a detecção de malária em amostras clínicas

Na otimização da linha de controlo, a diluição ótima do volume de anti-IgG utilizando bionanoconjugados AuNP-MUA-Anticorpo foi de 1:40, no entanto, utilizando bionanoconjugados AuNP-CALNN-Anticorpo a diluição ótima do anticorpo secundário foi de 1:90. O uso de nanopartículas revestidas com CALNN revelou ser assim uma mais-valia, tornando o teste menos dispendioso pela necessidade de menor quantidade de anticorpo anti-IgG na linha de controlo.

Aplicando culturas de sangue infetadas ou não infetadas com o parasita da malária, a diluição ótima de anticorpo secundário estabelecida nos ensaios anteriores não se verificou aquando da aplicação das culturas, estabelecendo-se então uma nova diluição, 1:20.

Numa análise global, verificou-se a interação entre o anticorpo secundário imobilizado na linha de controlo e o anticorpo anti-*Pf*HRP2 conjugado com as nanopartículas de ouro, obtendo-se uma boa intensidade de cor vermelha na linha de controlo.

Relativamente à linha de teste, obteve-se sinal na mesma na presença de bionanoconjugados AuNP-MUA-Anticorpo numa razão molar de 1:25 e aplicando 2,5 µL de *Pf*HRP2 a 2,6 mg.ml<sup>-1</sup>, 2,5 µL de anti-IgG 1:20 e 60 µL de culturas.

A falta de especificidade entre o anticorpo e o antigénio, bem como a baixa concentração da *Pf*HRP2 poderá ter contribuído em grande parte para a ausência de cor na linha de teste, no caso de se tratar de um resultado negativo.

Foram também realizados testes recorrendo a bionanoconjugados AuNP-MUA-Anticorpo, recorrendo a AuNP de 52 nm, de modo a averiguar se o fato de possuírem uma maior área superficial que as AuNP de 17 nm e por conseguinte a possibilidade de conjugação com um maior número de anticorpo anti-*Pf*HRP2 trazia vantagens na detecção, contudo não se obteve qualquer resultado na linha de controlo ou de teste.

Recorreu-se ao papel de fotocópia como substrato alternativo para o TDR, devido ao fato de ser um papel de mais baixo custo e apresentar uma cor mais branca quando comparado com o papel *Whatman* n°1, possibilitando um maior contraste de cor entre os bionanoconjugados e o papel. Contudo, devido à baixa porosidade do papel de fotocópia não ocorreu migração da solução de bionanoconjugados nem absorção dos mesmos pelo papel. O papel *Whatman* n°1 ao contrário do papel de fotocópia, apresenta uma elevada capacidade de absorção e uma porosidade elevada, permitindo a absorção das soluções aquosas e a sua respetiva migração através dos seus capilares.

## 5.2 Perspetivas futuras

A presente dissertação pode ser futuramente desenvolvida, no que respeita ao processo de produção e purificação da proteína *PfHRP2*, nomeadamente o passo de purificação onde deverão ser revistas as concentrações de imidazole utilizadas nos tampões, bem como fazer um gradiente de concentrações no tampão de eluição. O objetivo será a obtenção de uma maior concentração de antígeno *PfHRP2*.

Deverão então ser realizados estudos de especificidade, utilizando as técnicas de ELISA ou *Western-Blot*, onde em ambos os casos, deverá feita a imobilização do anticorpo anti-*PfHRP2* conjugado as nanopartículas de ouro para posterior detecção pelo antígeno *PfHRP2*. Essa detecção é conseguida através da emissão de fluorescência ou da detecção por UV-Visível.

De modo a aumentar a sensibilidade do TDR deverão ser realizados mais ensaios com as nanopartículas de ouro de 52 nm, uma vez que na presente dissertação não se obteve qualquer sinal nas linhas de teste e controlo. Podem ser utilizados diferentes agentes de revestimento para as nanopartículas, assim como podem ser testadas diferentes concentrações dos agentes de reticulação EDC/NHS, de forma a promover uma melhor ligação entre o anticorpo e as nanopartículas de ouro.

Após a otimização de todos os componentes do TDR (resolvido o problema de concentração da proteína *PfHRP2* e a especificidade entre a mesma e o anticorpo anti-*PfHRP2* e reajuste de volumes, no caso de ser necessário) poderá ser realizada uma plastificação do teste apenas onde existe a impressão a cera. Com a plastificação do TDR elimina-se o problema da elevação do canal por onde migram as culturas e das linhas de controlo e de teste, o que facilita a migração das culturas.

Futuramente o TDR desenvolvido poderá ser aplicado em amostras clínicas de sangue humano infetado com o parasita da malária.



## 6 Referências Bibliográficas

- [1] P. V Baptista, G. Doria, P. Quaresma, M. Cavadas, C. S. Neves, I. Gomes, P. Eaton, E. Pereira, and R. Franco, *Chapter 11 - Nanoparticles in Molecular Diagnostics*, vol. 104. 2011.
- [2] M. Peixoto de Almeida, E. Pereira, P. Baptista, I. Gomes, S. Figueiredo, L. Soares, and R. Franco, *Gold Nanoparticles as (Bio)Chemical Sensors*. 2014.
- [3] S. Mandal, “Epidemiological aspects of vivax and falciparum malaria: global spectrum,” *Asian Pacific J. Trop. Dis.*, vol. 4, pp. S13–S26, 2014.
- [4] N. J. White, S. Pukrittayakamee, T. T. Hien, M. A. Faiz, O. a Mokuolu, and A. M. Dondorp, “Malaria,” *Lancet*, vol. 383, no. 9918, pp. 723–35, Feb. 2014.
- [5] “Fact sheet on the world malaria report 2014.”
- [6] “MercyCorps - Thoughts on World Malaria Day.”
- [7] E. Hanssen, P. J. McMillan, and L. Tilley, “Cellular architecture of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes,” *Int. J. Parasitol.*, vol. 40, no. 10, pp. 1127–35, Aug. 2010.
- [8] “Q&A on artemisinin resistance.”
- [9] N. Tangpukdee, C. Duangdee, P. Wilairatana, and S. Krudsood, “Malaria Diagnosis : A Brief Review,” vol. 47, no. 2, pp. 93–102, 2009.
- [10] B. Sharew, M. Legesse, A. Anmut, D. Jima, G. Medhin, and B. Erko, “Evaluation of the performance of CareStart Malaria Pf/Pv Combo and Paracheck Pf tests for the diagnosis of malaria in Wondo Genet, southern Ethiopia,” *Acta Trop.*, vol. 111, no. 3, pp. 321–4, Sep. 2009.
- [11] “CDC - Malaria - Diagnosis & Treatment (United States) - Diagnosis (U\_S\_).”
- [12] C. Wongsrichanalai, M. J. Barcus, S. Muth, A. Sutamihardja, and W. H. Wernsdorfer, “A Review of Malaria Diagnostic Tools: Microscopy and Rapid Diagnostic Test (RDT),” *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, vol. 77, no. 6 Suppl, pp. 119–127, 2007.
- [13] A. Moody, “Rapid Diagnostic Tests for Malaria Parasites,” vol. 15, no. 1, pp. 66–78, 2002.
- [14] A. Laurent, J. Schellenberg, K. Shirima, S. C. Ketende, P. L. Alonso, H. Mshinda, M. Tanner, and D. Schellenberg, “Performance of HRP-2 based rapid diagnostic test for malaria and its variation with age in an area of intense malaria transmission in southern Tanzania,” *Malar. J.*, vol. 9, no. 1, p. 294, Jan. 2010.
- [15] H. Noedl, W. H. Wernsdorfer, R. S. Miller, and C. Wongsrichanalai, “Histidine-Rich Protein II : a Novel Approach to Malaria Drug Sensitivity Testing Histidine-Rich Protein II : a Novel Approach to Malaria Drug Sensitivity Testing,” vol. 46, no. 6, pp. 1658–1664, 2002.
- [16] H. Noedl, C. Wongsrichanalai, R. Scott Miller, K. Saw Aye Myint, S. Looreesuwan, Y. Sukthana, V. Wongchotigul, H. Kollaritsch, G. Wiedermann, and W. H. Wernsdorfer, “Plasmodium falciparum: effect of anti-malarial drugs on the production and secretion

- characteristics of histidine-rich protein II,” *Exp. Parasitol.*, vol. 102, no. 3–4, pp. 157–163, Nov. 2002.
- [17] J. Baker, M.-F. Ho, A. Pelecanos, M. Gatton, N. Chen, S. Abdullah, A. Albertini, F. Ariey, J. Barnwell, D. Bell, J. Cunningham, D. Djalle, D. F. Echeverry, D. Gamboa, J. Hii, M. P. Kyaw, J. Luchavez, C. Membi, D. Menard, C. Murillo, S. Nhem, B. Ogutu, P. Onyor, W. Oyibo, S. Q. Wang, J. McCarthy, and Q. Cheng, “Global sequence variation in the histidine-rich proteins 2 and 3 of *Plasmodium falciparum*: implications for the performance of malaria rapid diagnostic tests.,” *Malar. J.*, vol. 9, p. 129, Jan. 2010.
- [18] P. J. Rosenthal, “How do we best diagnose malaria in Africa?,” *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, vol. 86, no. 2, pp. 192–3, Feb. 2012.
- [19] P. S. Atchade, C. Doderer-Lang, N. Chabi, S. Perrotey, T. Abdelrahman, C. D. Akpovi, L. Anani, A. Bigot, A. Sanni, and E. Candolfi, “Is a *Plasmodium* lactate dehydrogenase (pLDH) enzyme-linked immunosorbent (ELISA)-based assay a valid tool for detecting risky malaria blood donations in Africa?,” *Malar. J.*, vol. 12, no. 1, p. 279, 2013.
- [20] S. Malik, S. Khan, A. Das, and J. C. Samantaray, “*Plasmodium* lactate dehydrogenase assay to detect malarial parasites.,” *Natl. Med. J. India*, vol. 17, no. 5, pp. 237–9, 2004.
- [21] E. E. Dzakah, K. Kang, C. Ni, H. Wang, P. Wu, S. Tang, J. Wang, J. Wang, and X. Wang, “*Plasmodium vivax* aldolase-specific monoclonal antibodies and its application in clinical diagnosis of malaria infections in China.,” *Malar. J.*, vol. 12, no. 1, p. 199, 2013.
- [22] C. K. Murray and J. W. Bennett, “Rapid Diagnosis of Malaria,” vol. 2009, no. 8, 2009.
- [23] N. S. Lipman, L. R. Jackson, L. J. Trudel, and F. Weis-Garcia, “Monoclonal Versus Polyclonal Antibodies: Distinguishing Characteristics, Applications, and Information Resources,” *ILAR J.*, vol. 46, no. 3, pp. 258–268, Jan. 2005.
- [24] “An Introduction to Antibodies Pacific Immunology.” .
- [25] M. Arruebo, M. Valladares, and Á. González-Fernández, “Antibody-Conjugated Nanoparticles for Biomedical Applications,” *J. Nanomater.*, vol. 2009, pp. 1–24, 2009.
- [26] M. Sajid, A.-N. Kawde, and M. Daud, “Designs, formats and applications of lateral flow assay: A literature review,” *J. Saudi Chem. Soc.*, Sep. 2014.
- [27] J. Hu, S. Wang, L. Wang, F. Li, B. Pingguan-Murphy, T. J. Lu, and F. Xu, “Advances in paper-based point-of-care diagnostics.,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 54, pp. 585–97, Apr. 2014.
- [28] M. N. Costa, B. Veigas, J. M. Jacob, D. S. Santos, J. Gomes, P. V Baptista, R. Martins, J. Inácio, and E. Fortunato, “A low cost, safe, disposable, rapid and self-sustainable paper-based platform for diagnostic testing: lab-on-paper.,” *Nanotechnology*, vol. 25, no. 9, p. 094006, Mar. 2014.
- [29] D. D. Liana, B. Raguse, J. J. Gooding, and E. Chow, “Recent advances in paper-based sensors.,” *Sensors (Basel)*, vol. 12, no. 9, pp. 11505–26, Jan. 2012.
- [30] R. Pelton, “Bioactive paper provides a low-cost platform for diagnostics,” *TrAC Trends Anal. Chem.*, vol. 28, no. 8, pp. 925–942, Sep. 2009.

- [31] “Nanotechnology 101 Nano.” .
- [32] J. Hammond, N. Bhalla, S. Rafiee, and P. Estrela, “Localized Surface Plasmon Resonance as a Biosensing Platform for Developing Countries,” *Biosensors*, vol. 4, no. 2, pp. 172–188, 2014.
- [33] K. a. Willets and R. P. Van Duyne, “Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy and Sensing,” *Annu. Rev. Phys. Chem.*, vol. 58, no. 1, pp. 267–297, 2007.
- [34] J. Kimling, M. Maier, B. Okenve, V. Kotaidis, H. Ballot, and a Plech, “Turkevich Method for Gold Nanoparticle Synthesis Revisited,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 110, no. 32, pp. 15700–15707, 2006.
- [35] P. Baptista, E. Pereira, P. Eaton, G. Doria, A. Miranda, I. Gomes, P. Quaresma, and R. Franco, “Gold nanoparticles for the development of clinical diagnosis methods.,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 391, no. 3, pp. 943–50, Jun. 2008.
- [36] “Gold Nanoparticles Optical Properties.” .
- [37] R. a. Sperling and W. J. Parak, “Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles,” *Philos. Trans. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.*, vol. 368, no. 1915, pp. 1333–1383, 2010.
- [38] R. Lévy, N. T. K. Thanh, R. Christopher Doty, I. Hussain, R. J. Nichols, D. J. Schiffrin, M. Brust, and D. G. Fernig, “Rational and combinatorial design of peptide capping ligands for gold nanoparticles,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 126, no. 32, pp. 10076–10084, 2004.
- [39] R. Lévy, “Peptide-Capped Gold Nanoparticles: Towards Artificial Proteins,” *ChemBioChem*, vol. 7, no. 8, pp. 1141–1145, 2006.
- [40] S. R. Saptarshi, A. Duschl, and A. L. Lopata, “Interaction of nanoparticles with proteins: relation to bio-reactivity of the nanoparticle.,” *J. Nanobiotechnology*, vol. 11, no. 1, p. 26, Jan. 2013.
- [41] W. Haiss, N. T. K. Thanh, J. Aveyard, and D. G. Fernig, “Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from UV–Vis Spectra,” *Anal. Chem.*, vol. 79, no. 11, pp. 4215–4221, 2007.
- [42] M. Ndonwi, O. O. Burlingame, A. S. Miller, D. M. Tollefsen, G. J. B. Jr, D. E. Goldberg, and H. Ii, “Inhibition of antithrombin by Plasmodium falciparum histidine-rich protein II,” vol. 117, no. 23, pp. 6347–6355, 2015.
- [43] “Sigma - Sodium citrate tribasic dihydrate.”
- [44] I. Gomes, M. J. Feio, N. C. Santos, P. Eaton, A. P. Serro, B. Saramago, E. Pereira, and R. Franco, “Controlled adsorption of cytochrome c to nanostructured gold surfaces,” *J. Nanoparticle Res.*, vol. 14, pp. 1–12, 2012.
- [45] K. Kishi, T. Yasuda, and H. Takeshita, “DNase I: Structure, function, and use in medicine and forensic science,” *Leg. Med.*, vol. 3, no. 2, pp. 69–83, 2001.
- [46] J. a. Bornhorst and J. J. Falke, “Purification of Proteins Using Polyhistidine Affinity Tags,” *Methods Enzymol.*, vol. 326, no. 16, pp. 245–254, 2000.

- [47] B. Veigas, J. M. Jacob, M. N. Costa, D. S. Santos, M. Viveiros, J. Inácio, R. Martins, P. Barquinha, E. Fortunato, and P. V. Baptista, “Gold on paper–paper platform for Au-nanoprobe TB detection,” *Lab Chip*, vol. 12, no. 22, p. 4802, 2012.
- [48] J. Conde, J. T. Dias, V. Graça, M. Moros, P. V. Baptista, and J. M. de la Fuente, “Revisiting 30 years of biofunctionalization and surface chemistry of inorganic nanoparticles for nanomedicine,” *Front. Chem.*, vol. 2, no. July, pp. 1–27, 2014.
- [49] D. Bartczak and A. G. Kanaras, “Preparation of peptide-functionalized gold nanoparticles using one pot EDC/Sulfo-NHS coupling,” *Langmuir*, vol. 27, no. 16, pp. 10119–10123, 2011.
- [50] M. Romão, “Nanoimunoensaios para a Detecção de Antígenos da Malária em Amostras Clínicas,” pp. 1–105, 2014.
- [51] “Whatman® Grade 1 Qualitative Filtration Paper.”
- [52] A. Marques, “Desenvolvimento de um sensor colorimétrico em papel para a detecção de bactérias eletroquimicamente ativas,” pp. 1–115, 2014.
- [53] M. Costa, “Desenvolvimento de microfluídica em papel para utilização de biossensores,” pp. 1–138, 2012.
- [54] P. Menter, “Acrylamide Polymerization—A Practical Approach,” *Bio-Rad Tech Note*, p. 1156, 2000.
- [55] “Bicinchoninic Acid Kit.”
- [56] P. K. Smith, R. I. Krohn, G. T. Hermanson, a. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson, and D. C. Klenk, “Measurement of protein using bicinchoninic acid,” *Anal. Biochem.*, vol. 150, no. 1, pp. 76–85, 1985.
- [57] K. J. Wiechelman, R. D. Braun, and J. D. Fitzpatrick, “Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: Identification of the groups responsible for color formation,” *Anal. Biochem.*, vol. 175, no. 1, pp. 231–237, 1988.
- [58] W. Chew and P. Sharratt, “Process analytical technology,” *Anal. Methods*, vol. 2, no. 10, p. 1412, 2010.
- [59] H. Förster, “UV / VIS Spectroscopy,” *Mol. Sieves*, vol. 4, pp. 337–426, 2004.
- [60] C. a Evans and S. Wilson, “Materials characterization.”
- [61] D. K. Schroder, *MATERIAL AND DEVICE SEMICONDUCTOR MATERIAL AND DEVICE Third Edition*, vol. 44, no. 4. 2006.

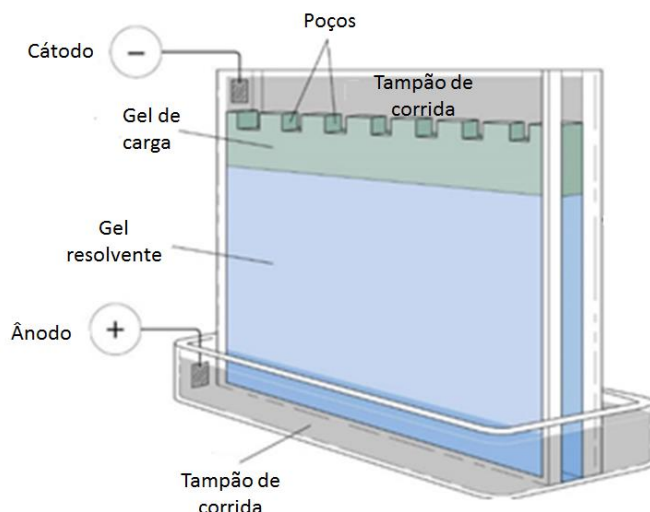
## Anexos

### A Eletroforese

A eletroforese é uma técnica de separação de moléculas que se baseia na mobilidade eletroforética quando as mesmas são submetidas a um campo elétrico. A velocidade de migração depende da força do campo aplicado, da carga, do tamanho, da forma, da força iónica, da viscosidade, e temperatura do meio. Esta técnica pode ser realizada em condições nativas (PAGE) ou desnaturantes (SDS-PAGE). Quando realizada em condições nativas o princípio de separação baseia-se na carga e na forma das proteínas. Quando realizada em condições desnaturantes o princípio de separação baseia-se apenas na massa molecular das proteínas.

Os géis de poliacrilamida são formados através da copolimerização de acrilamida e bis-acrilamida. Esta polimerização é iniciada pelo N,N,N',N'-Tetrametiletenodiamina (TEMED) e do persulfato de amónio (APS). O TEMED acelera a taxa de formação de radicais livres do persulfato de amónio, onde estes, por sua vez, catalisam a polimerização. Os radicais livres do persulfato convertem os monómeros de acrilamida em radicais livres, que irão reagir com os monómeros inativados para dar início à reação em cadeia de polimerização. A concentração de acrilamida determina o comprimento das cadeias de poliacrilamida e a de bis acrilamida o grau de *cross linking*. Ambas as propriedades determinam as características do gel, em particular o tamanho do poro e a densidade. O detergente aniónico dodecil sulfato de sódio (SDS) tem como função a desnaturação das proteínas, quebrando as pontes dissulfureto e a dissolução de moléculas hidrofóbicas, levando estas a voltarem à sua estrutura primária e a adquirirem carga negativa. Cada corrida é composta por dois géis: o gel de carga e o gel resolvente. O primeiro é composto por uma baixa concentração de acrilamida, serve para concentrar a amostra e para todas as proteínas iniciarem a corrida ao mesmo tempo. Por outro lado, o gel resolvente é composto por uma concentração superior de acrilamida, de acordo com a gama de massas moleculares da amostra. É também utilizado um marcador de pesos moleculares de forma a acompanhar a corrida e a estimar o peso molecular das proteínas em estudo, quando desconhecido.

A revelação do gel, após cada corrida, pode ser realizada à custa de uma solução corante, composta por azul de coomassie. Quando já são visíveis as bandas no gel, este é então colocado numa solução descorante [54]. Na Figura 0.1 está ilustrado o esquema da colocação correta de um gel de poliacrilamida numa tina vertical. É de referir que no decorrer deste trabalho apenas se recorreu ao SDS-PAGE.



**Figura 0.1**– Esquema de um gel de poliacrilamida numa tina vertical. Adaptado de <http://www.siumed.edu/~bbartholomew/images/chapter6/F06-21.jpg>, consultado a 23.06.2015.

### A1 Preparação das amostras

A Tabela 1 indica os volumes de reagentes a utilizar na preparação dos géis de resolução e de carga.

**Tabela 0.1** - Volume de reagentes a utilizar na preparação dos géis de poliacrilamida em condições desnaturantes. Os volumes apresentados são referentes à preparação de um gel de 10%.

Reagentes	Gel resolvente 10%,	Gel de carga 5%,
	Vf = 5000 $\mu$ L	Vf = 3000 $\mu$ L
Água	2000	2100
Acrilamida/Bisacrilamida 30%	1700	500
Tris-HCl 1,5 M, pH = 8,8	1300	380
SDS 10%	50	30
APS 10%	50	30
TEMED	2	3

De modo a desnaturar as amostras, foi adicionado uma solução denominada tampão de amostra, composta por SDS,  $\beta$ -mercapetanol e azul de bromofenol, na proporção 1:1 às amostras em estudo. Estas são posteriormente fervidas durante 2- 3 minutos. De seguida aplicou-se então as amostras no gel SDS-PAGE. Todas as corridas foram realizadas a 150 V durante 70 minutos em tampão de corrida

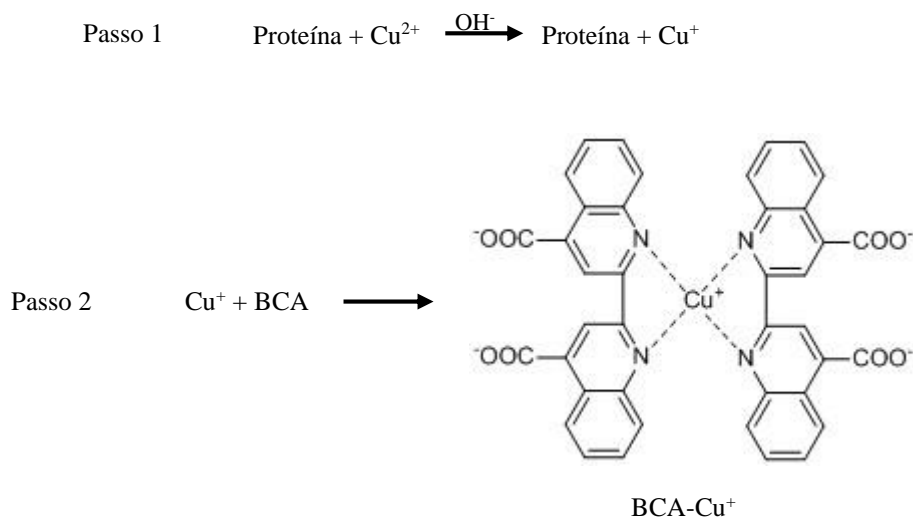
Desenvolvimento de um teste de diagnóstico rápido para a detecção de malária em amostras clínicas

(Tris-Glicina). O marcador de pesos moleculares (Bio-Rad LMN Range) foi utilizado na mesma proporção de volumes, 10 µL de marcador e 10 µL de tampão de amostra.

Após a eletroforese o gel é mergulhado numa solução corante azul de Coomassie R-250 0,5% (azul de coomassie R-250, 15 mL de ácido acético, 90 mL de metanol e água até perfazer 200 mL de solução) durante 30 minutos e depois numa solução descorante (75 mL de ácido acético, 450 mL metanol e água até perfazer 1L de solução) até as bandas ficarem perceptíveis.

## B Quantificação de proteínas pelo método do ácido bicinconínico

A quantificação de proteínas pelo método do ácido bicinconínico (BCA) baseia-se na formação do complexo  $\text{Cu}^{2+}$ -Proteína sob condições alcalinas, seguido da redução de  $\text{Cu}^{2+}$  para  $\text{Cu}^+$  pelos aminoácidos cisteína, triptofano, tirosina e pela ligação peptídica. O BCA forma um complexo azul-púrpura com  $\text{Cu}^+$  em meio alcalino, permitindo a monitorização alcalina de  $\text{Cu}^{2+}$  pelas proteínas a um máximo de absorvância a 562 nm (Figura 0.2). É um método aplicável a uma larga gama de concentrações, é rápido e sensível [55], [56], [57]



**Figura 0.2**– Formação do complexo BCA- $\text{Cu}^+$ . Adaptado de [56]

### B1 Determinação da concentração da proteína *PfHRP2* pelo método do BCA

O método do BCA consiste na preparação de uma solução contendo BCA (solução A) e sulfato de cobre (II) na proporção de 50:1. A solução deve ser homogeneizada no vortex. De seguida adicionou-se varias quantidades de proteína padrão (BSA 1 mg.mL<sup>-1</sup>) e uma quantidade fixa da solução preparada anteriormente, como se pode observar pela Tabela 0.2.

**Tabela 0.2** - Volumes em  $\mu\text{L}$  de proteína padrão e de solução A+B

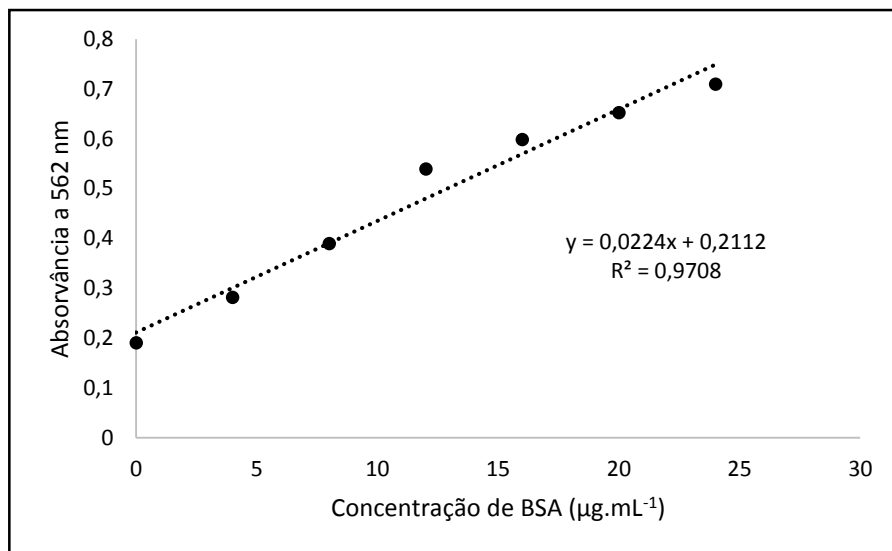
<i>Eppendorf</i>	$\mu\text{L}$ de proteína padrão	$\mu\text{L}$ da solução A+B
0	-	1000
1	4	1000
2	8	1000
3	12	1000
4	16	1000
5	20	1000
6	24	1000

Preparou-se soluções com a proteína *PfHRP2* e solução A+B, como se pode ver na Tabela 0.3. As soluções são preparadas em duplicado.

**Tabela 0.3** – Volumes em  $\mu\text{L}$  de proteína HRP2 e de solução A+B.

<i>Eppendorf</i>	$\mu\text{L}$ de HRP2	$\mu\text{L}$ da solução A+B
7	2	1000
8	2	1000
9	5	1000
10	5	1000
11	10	1000
12	10	1000
13	15	1000
14	15	1000

Todas as soluções foram incubadas numa estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos. Após esse tempo, foram medidos os valores de absorvâncias ao comprimento de onda de 562 nm, e criada a reta de calibração (Figura 0.3) que nos permitiu, posteriormente, calcular as concentrações da proteína em estudo (*PfHRP2*). Os cálculos podem ser consultados no ponto 4.6 da apresentação e discussão de resultados.



**Figura 0.3** – Reta de calibração obtida pelo método de BCA para a quantificação da proteína PfHRP2 recombinante.

## C Espectroscopia de UV-Visível

A absorção da radiação eletromagnética na região do ultravioleta e visível por parte de moléculas está associada a transições eletrônicas, que ocorrem quando, um elétron transita de um estado de mais baixa energia para um estado de energia mais elevada, por interação da radiação eletromagnética com o meio envolvente.

Quando a radiação eletromagnética atravessa uma amostra, parte da radiação vai ser absorvida, enquanto a restante será transmitida pela mesma. A razão entre a intensidade de luz que atravessa a amostra,  $I_0$  e a que sai da amostra,  $I$  é denominada por transmitância,  $T$  (equação 1).

$$T = \frac{I_0}{I} \quad \text{Equação 1}$$

A quantidade de luz absorvida quando um feixe de radiação monocromática atravessa o meio envolvente depende da concentração, do coeficiente de extinção molar e do percurso ótico da radiação.

A absorvância (Abs) de uma solução é o logaritmo negativo da transmitância (equação 2)

$$Abs = -\log(T) \quad \text{Equação 2}$$

É possível determinar a concentração ( $c$ ) de um composto, através da lei de Lambert-Beer, que indica que para uma solução ideal existe uma relação linear entre a concentração e a absorvância, desde que o percurso ótico ( $l$ ) se mantenha constante. O coeficiente de extinção molar ( $\epsilon$ ) é característico para cada tipo de transição eletrônica em cada espécie absorvente e depende do comprimento de onda. A lei de Lambert-Beer está representada pela equação 3 [58], [59].

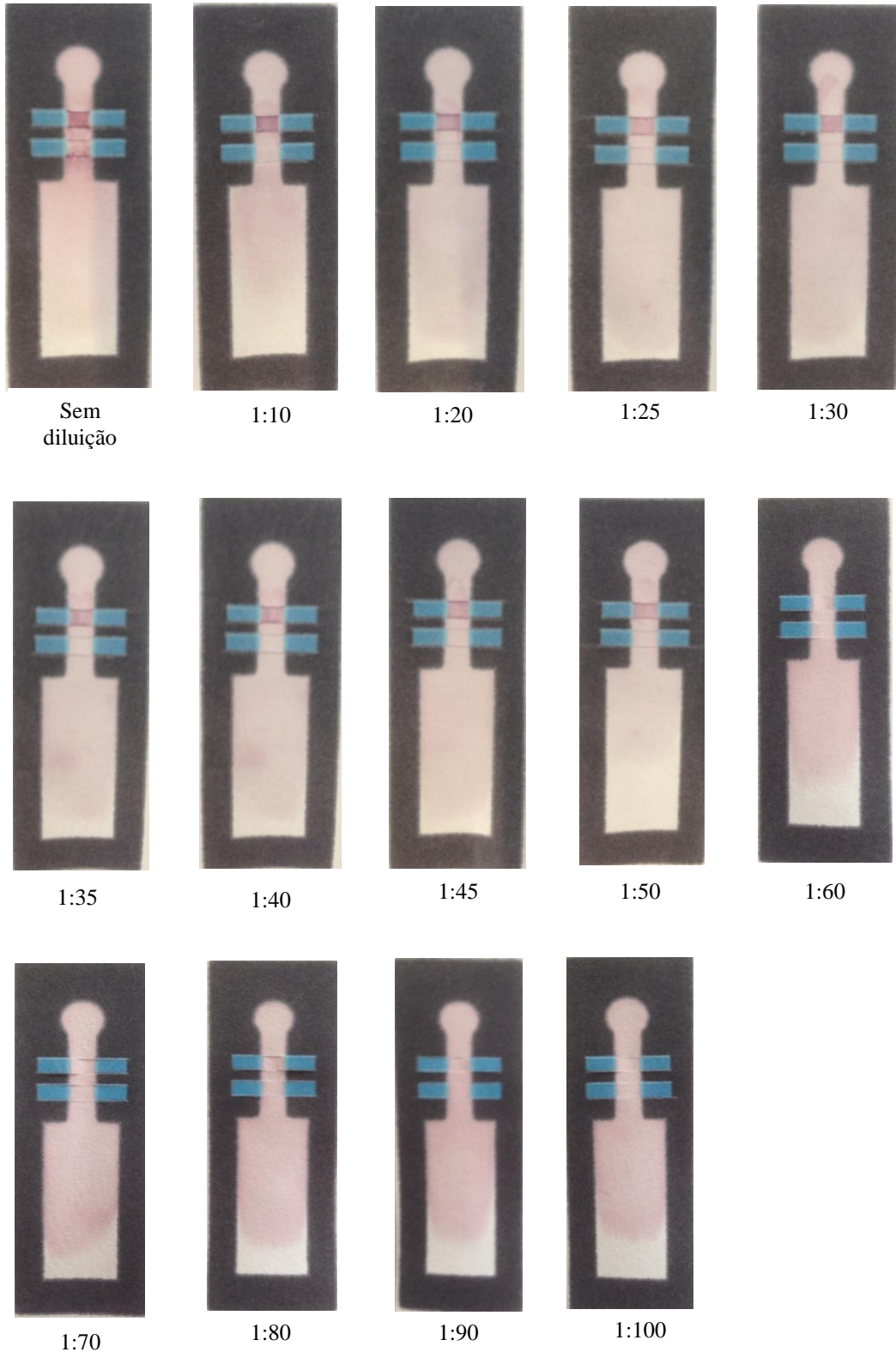
$$Abs = c \times \epsilon \times l \quad \text{Equação 3}$$

## **D Microscopia eletrónica de varrimento**

A microscopia eletrónica utiliza um feixe de eletrões de modo a produzir uma imagem magnificada da superfície da amostra. O princípio de funcionamento da microscopia eletrónica de varrimento baseia-se na incidência de um feixe de eletrões num ponto da superfície da amostra e na recolha dos sinais eletrónicos emitidos pelo material. As amostras são percorridas sequencialmente por um feixe de eletrões acelerado por uma tensão, finamente focado através de um sistema de lentes eletromagnéticas. Da interação do feixe eletrónico com a amostra resulta a emissão de diversos tipos de radiação e eletrões, entre os quais os eletrões secundários utilizados na formulação da imagem da amostra [60], [61].

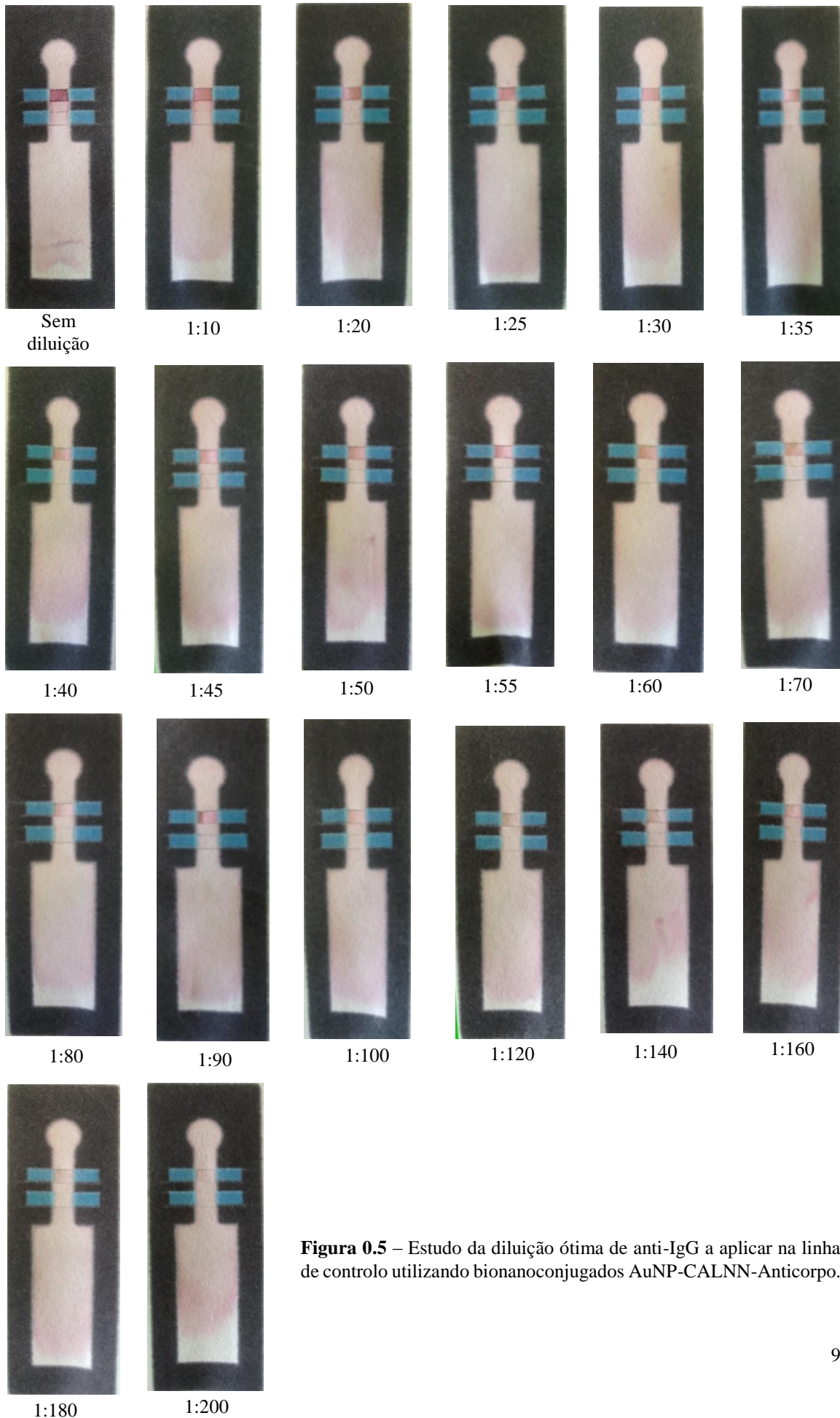
**Conjunto de TDR utilizados para estabelecer a diluição ótima de anticorpo anti-IgG a aplicar na linha de controlo utilizando bionanoconjugados:**

**E1 AuNP-MUA-Anticorpo**



**Figura 0.4** – Estudo da diluição ótima de anti-IgG a aplicar na linha de controlo utilizando bionanoconjugados AuNP-MUA-Anticorpo.

**E2 AuNP-CALNN-Anticorpo**



**Figura 0.5** – Estudo da diluição ótima de anti-IgG a aplicar na linha de controlo utilizando bionanoconjugados AuNP-CALNN-Anticorpo.