

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE,
SOCIEDADE E ENDEMIAS NA AMAZÔNIA

Desenvolvimento de um método de solubilização de
nanotubos de carbono e sua aplicação em imunoenaios

STEFANE REIS PEREIRA

MANAUS

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE,
SOCIEDADE E ENDEMIAS NA AMAZÔNIA

STEFANE REIS PEREIRA

Desenvolvimento de um método de solubilização de
nanotubos de carbono e sua aplicação em imunoenaios

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Saúde, Sociedade e Endemias na
Amazônia como parte das exigências
do Programa para obtenção do título
de Mestre. Linha de pesquisa:
Biologia de agentes Infecciosos e
Parasitários

Orientador: Prof. Dr. Luis Andre Morais Mariuba

MANAUS

2016

STEFANE REIS PEREIRA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde, Sociedade e Endemias na Amazônia como parte das exigências do Programa para obtenção do título de Mestre. Linha de pesquisa: Biologia de agentes Infecciosos e Parasitários

Aprovada em 30 de setembro de 2016.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luis Andre Morais Mariuba
Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD/Fiocruz-AM)

Prof. Dr. Marcos César Fernandes Pessoa
Universidade Federal do Amazonas (UFAM)

Prof. Dr. Felipe Arley Costa Pessoa
Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD/Fiocruz-AM)

Dedico esta dissertação
primeiramente a Deus, que me deu
força, sabedoria e permitiu a
conclusão deste trabalho. À minha
família, pelo total apoio nos
momentos difíceis. Também a
todos que contribuíram para a
conclusão desta dissertação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus que guiou minha jornada e permitiu que eu chegasse até aqui.

Ao ILMD/FIOCRUZ AMAZÔNIA e a FAPEAM por todo o auxílio físico e financeiro, fundamentais para o cumprimento deste projeto.

A minha família, pelo força, apoio e encorajamento recebido.

Ao Samuel Oliveira, por todos os momentos em que esteve ao meu lado, ajudando e incentivando até o cumprimento deste.

Ao Dr. André Luiz Morais Mariuba, pela compreensão, orientação e ajuda.

Ao Dr. Walter Ricardo Brito, ao Msc. Yuri Chaves e a mestranda Jacqueline Orellana pela disponibilidade na caracterização dos nanotubos.

Ao Dr. Felipe Gomes Naveca e ao Msc. Victor Souza, pela ajuda na produção das fitas imunocromatográficas.

A Msc. Elizangela Farias pela orientação no estágio em docência.

Aos colegas e parceiros de laboratório Marla, Edilene, Juliane, Felipe, Lucas, Diogo, Lucyane e Jusselene por toda a ajuda.

Aos funcionários e técnicos da Fiocruz Amazonas, em especial os do laboratório.

RESUMO

Desde que foram descobertos, os nanotubos de carbono têm despertado o interesse de muitos pesquisadores devido às suas propriedades físicas, químicas e eletrônicas que possibilitam sua aplicação nas mais diversas áreas de conhecimento, incluindo aplicações biomédicas. Os nanotubos de carbono podem ser utilizados como nanosensores e ser utilizado como sensor de detecção de patógenos. Contudo, para sua aplicação em imunoenaios é preciso que haja uma boa solubilização destes nanotubos de carbono. O problema para uma boa solubilização é a agregação de nanotubos de carbono que reduz as importantes propriedades desses materiais, propostas para um único nanotubo. Este trabalho buscou desenvolver nanotubos de carbono solúveis aplicáveis em sistemas de fluxo lateral. Para isso foram utilizadas proteínas recombinantes ("Proteína 2" rica em Histidina, HRP2) obtidos em trabalhos anteriores. Além disso, foi realizada a caracterização física dos nanotubos de carbono através das análises por espectroscopia Raman, espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-Vis), espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIV). Sua capacidade de dispersão e funcionalização foi medida por citometria de fluxo. Este trabalho mostrou que esta metodologia de solubilização de nanotubos de carbono permite sua utilização em sistemas de fluxo lateral, o que o torna interessante não só pela detecção de antígenos maláricos demonstrados neste estudo, mas também por outras aplicações em métodos de detecção. Esta metodologia de solubilização de nanotubos de carbono torna estes materiais aplicáveis em imunoenaios, cromatografias e testes moleculares.

Palavras-chave: nanotubos de carbono; imunoenaios; biosensores

ABSTRACT

Since they were discovered, the carbon nanotubes have attracted the interest of many researchers due to their physical, chemical and electronic properties that allow its application in different areas of knowledge, including biomedical applications. Carbon nanotubes may be used as nanosensors and used as pathogens detection sensor. However, for application in immunoassays there must be a good solubilization of these carbon nanotubes. The problem for a good solubilization is aggregation of carbon nanotubes which reduces the important properties of these materials, proposals for a single nanotube. This study sought a method for solubilization of carbon nanotubes and their application in lateral flow systems. For this they used recombinant proteins ("protein 2" rich in Histidine, HRP2) already obtained in previous work. In addition, the physical characteristics of carbon nanotubes was obtained through analysis by Raman spectroscopy, absorption spectroscopy in the ultraviolet-visible region (UV-Vis) spectroscopy in the infrared Fourier transform (FTIR) was performed. And its dispersion and functionalization was measured by flow cytometry. This work showed that methodology dispersion of carbon nanotubes allows their use in lateral flow systems. What makes it interesting not only for the detection of malarial antigens demonstrated in this study, but also for other applications in detection methods. This carbon nanotube solubilization methodology makes these nanotubes applicable in Immunoassays, chromatography and molecular tests.

Keywords: Carbon nanotubes; immunoassays; biosensors

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Diagrama da formação de nanotubos de carbono a partir de uma folha de grafite	18
Figura 2: Tipos de nanotubos de carbono e sua respectiva geometria:.....	19
Figura 3: Testes imunocromatográficos. A – Sistema de detecção utilizado nos TDRs tradicionais; B- Sistema de detecção proposto neste projeto para detecção quantitativa de antígenos da malária utilizando NTCs.....	26
Figura 4: Fluxograma esquemático dos ciclos de sonicação – centrifugação para obtenção de NTCs solúveis em água.....	35
Figura 5: Esquema da distribuição das membranas absorventes, fibra de vidro e membrana de nitrocelulose após a montagem do sistema em fluxo lateral.....	37
Figura 6: Exemplo do uso da Espectroscopia Raman na identificação de substâncias.....	39
Figura 7: Espectro de infravermelho antes e depois da aplicação do cálculo da transformada de Fourier.....	41
Figura 8: Testes de corrida em fluxo lateral.....	44
Figura 9: Ensaio competitivo em fluxo lateral.....	45
Figura 10: Testes de fluxo dos NTCs com alterações na metodologia descrita por Abera e Choi (2010).....	46
Figura 11: Fluxo do NTC filtrado – teste de fluxo do NTC depois da filtração, ausência de retenção na porção inferior da fita.....	47
Figura 12: Etapas do teste de solubilização em água.....	48
Figura 13: Fluxo do NTC filtrado bloqueado por BSA – Nas fitas com BSA não foram observadas reconhecimento inespecífico. Na fita com NTC filtrado ativado um fraco reconhecimento inespecífico é observado na linha teste e linha controle.....	49

Figura 14:	Testes de fluxo com a fibra de vidro – Na foto, nota-se que a fibra de vidro com 15µL está mais clara e a de 60µL mais escura que as demais, esta última apresentando maior retenção de NTCs na fibra.....	51
Figura 15:	Bloqueio das fibras de vidro com BSA e sacarose (SAC).....	52
Figura 16:	Fitas após ensaio. Na fita 1 ac. à 4µg/µL; na fita 2 anticorpo a 2µg/µL; na fita 6 não é possível visualizar banda na zona de captura indicada por seta.retida na membrana.....	53
Figura 17:	Teste em NTCs bloqueados após acoplamento.....	54
Figura 18:	Membranas de nitrocelulose das fitas produzidas em Biomanguinhos após teste de corrida. A) Controle negativo, aparecendo somente a banda controle. B e C fitas testas com uso de proteína recombinante, surgimento de banda nas linhas teste e controle.....	55
Figura 19:	Espectro Raman dos (a) nanotubos de carbono de paredes múltiplas (Pristine MWCNTs) antes do processo de dispersão e (b) espectro do PVP.....	57
Figura 20:	Comparação dos espectros Raman de cada uma das etapas de dispersão de MWCNTs em PVP.....	58
Figura 21:	Espectro de absorbância na região UV-Vis de soluções aquosas de MWCNT nas diferentes etapas de imobilização e acoplamento de anticorpos (A-LDH).....	60
Figura 22	Espectros de absorção no FTIR de MWCNTs nas diferentes etapas de solubilização e imobilização.....	63

Figura 23:	Análise de nanotubos de carbono (NTC) por citometria de fluxo.....	64
Figura 24:	Análise por citometria de fluxo para determinação de porcentagens de fluorescência de anticorpos conjugados com isotiocianato de fluoresceína (FITC) acoplados em NTCs em amostras não acopladas (A) e acopladas (B).....	65
Figura 25:	Citometria de fluxo, NTC tratado com PBS e NTC tratado com PVP.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL	Microlitro
AM	Amazonas
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
ILMD	Instituto Leônidas e Maria Deane
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
V	Volt
pLDH	Lactato desidrogenase parasito-específica
RAVREDA	Rede Amazônica de Vigilância da Resistência às drogas antimaláricas no Brasil
SIVEP/Malária	Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica da malária

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 JUSTIFICATIVA.....	15
3 OBJETIVOS.....	16
3.1 Objetivo Geral.....	16
3.2 Objetivos específicos.....	16
4 REVISÃO DA LITERATURA.....	17
4.1 Nanotubos de carbono.....	17
4.1.1 Estrutura dos nanotubos de carbono e suas propriedades.....	17
4.1.2 Dispersão dos nanotubos de carbono.....	20
4.1.3 Utilização de nanotubos de carbono em testes de detecção.....	22
4.2 Diagnóstico.....	24
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	32
5.1 Preparo dos nanotubos de carbono.....	32
5.1.1 Preparo de acordo com a metodologia descrita por Abera e Choi (2010)..	32
5.1.2 Preparo de acordo com a metodologia descrita por Xue <i>et al.</i> , (2008).....	33
5.1.3 Preparo de acordo com a metodologia desenvolvida neste trabalho.....	33
5.2 Funcionalização dos nanotubos de carbono.....	35
5.3 Montagem do sistema imunocromatográfico.....	36
5.4 Caracterização dos nanotubos de carbono solúveis.....	38
5.4.1 Espectroscopia Raman.....	38
5.4.2 Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-Vis)	39
5.4.3 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIV)	40
5.4.4 Citometria de Fluxo.....	41
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
6.1 Preparação dos nanotubos de carbono.....	43
6.1.1 Testes de solubilidade e fluxo em <i>lateral flow</i> de NTCs preparados segundo a metodologia de Xue <i>et al.</i> ,(2008).....	43
6.1.2 Testes de solubilidade e fluxo em <i>lateral flow</i> de NTCs preparados segundo a metodologia descrita por Abera e Choi (2010).....	43
6.1.3 Testes de fluxo e solubilidade dos nanotubos de carbono preparados segundo a metodologia desenvolvida neste trabalho.....	46
6.2 Aplicação dos nanotubos de carbono em Imunoensaios.....	49
6.3 Caracterização física dos nanotubos de carbono.....	56
6.3.1 Espectroscopia Raman.....	56
6.3.2 Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-Vis).....	58
6.3.3 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier.	60
6.3.4 Citometria de fluxo.....	63
7. CONCLUSÃO.....	67
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68

1 INTRODUÇÃO

Os biossensores são dispositivos pequenos utilizados em diversas aplicações, geralmente para detecção de analitos-alvo que utilizam um elemento bioativo ou transdutor através de reações biológicas. Quando descobertos em 1991 os nanotubos de carbono surgiram como um dos nanomateriais mais promissores para o desenvolvimento de biossensores em nanoescala (IIJIMA, 1991; HAICK, 2013; HERBST, 2004).

Os nanotubos de carbono são nanomateriais em forma de tubo que possuem propriedades elétricas, mecânicas e ópticas ideais para aplicação em diversas áreas. Suas propriedades promissoras dependem da sua geometria, o que tem se apresentado como um problema para sua aplicação. Para sanar este problema, são utilizados diversos tratamentos na sua produção, por meio do processo de funcionalização.

Muitos estudos buscando novas metodologias de funcionalização de nanotubos para sua aplicação como biossensores vêm sendo estudadas. A utilização de polímeros dispersantes para obtenção de solubilidade em água de nanotubos de carbono foi estudada por Xue *et al.*, (2008) ao utilizar um dispersante polimérico poli (anidrido estireno-co-maleico) hidrolisado (HSMA) na preparação dos nanotubos solúveis.

Outros surfactantes também têm sido amplamente estudados. Os nanotubos de carbono tratados com polietilenoglicol (PEG), chamados de nanotubos peguilados, geralmente são tratamento em combinação de ciclos de centrifugação e tratamentos com ultrassom para dispersão dos nanotubos. Apesar de apresentar boa solubilidade em solução aquosa diferenças da densidade de PEG na superfície dos nanotubos de carbono interferem diretamente na capacidade de manutenção da sua dispersão (LIU *et al.*,2014).

Outro surfactante, o polivinil pirrolidona (PVP), tem dado resultados promissores e foi o surfactante escolhido na metodologia proposta por este trabalho. O PVP foi utilizado na dispersão de nanotubos de carbono e foram aplicados pela primeira vez em um sistema imunocromatográfico num estudo de Abera e Choi (2010).

Neste método, o nanotubo de carbono em solução de água deionizada é tratado com PVP e submetido à sonicação. Além disso, os nanotubos de carbono também são tratados com EDC e Sulfo-NHS. Os nanotubos de carbono são tratados com EDC e Sulfo-NHS para ativar a ligação covalente entre o grupo carboxi (-COOH) dos NTCs e as aminas primárias (-NH₂) dos anticorpos. Neste trabalho esta metodologia foi testada para aplicação em sistema em fluxo lateral.

A preocupação com a estabilidade dos nanotubos dispersos em água também foi demonstrada no estudo de Hong *et al.*, (2005). Após diversas tentativas de solubilização dos nanotubos em água foi alcançada a dispersão através da funcionalização dos nanotubos de carbono com o polímero Poli(N-isopropilacrilamida), mas foram encontradas dificuldades na manutenção desta dispersão, pois o nanotubo funcionalizado apresentou ser muito sensível à mudanças da temperatura da água. Estes nanotubos de carbono quando dispersos em água formam aglomerados quando a temperatura alcança os 35°C.

Buscando uma metodologia que possibilitasse a aplicação em sistema em fluxo lateral, uma nova metodologia de preparo de NTC solúvel em água foi desenvolvida. A metodologia criada utiliza PVP no tratamento dos nanotubos de carbono.

A caracterização física dos nanotubos de carbono é importante para a solubilização, pois se sabe que esta solubilização é fortemente influenciada pela orientação em que a lâmina de grafite é enrolada. A ligação do surfactante à superfície do nanotubo é influenciada pelas falhas apresentadas na superfície do nanotubo de carbono, o que pode influenciar na dispersão.

Outra possibilidade de aplicação dos nanotubos seriam em testes de detecção de células tumorais. Os nanotubos também podem ser funcionalizados e incorporados às cadeias biológicas. Sua aplicação está sendo testada em estudos que visam criar novos testes de detecção de células tumorais e eventuais aplicações terapêuticas. Estes estudos buscam uma melhor compreensão do comportamento desses nanotubos de carbono e sua distribuição *in vivo* pelos tecidos. Mesmo estando em fase inicial, os resultados encontrados se mostram promissores (JAIN, 2008; LIU *et al.*, 2014).

As propriedades interessantes dos nanotubos de carbono, como a alta resistência mecânica, capilaridade e sua especial estrutura levantam novas possibilidades de aplicações no futuro, o que vem provocando um aumento na utilização destes nanotubos de carbono. As possíveis aplicações incluem dispositivos semicondutores em escala manométrica, dispositivos para armazenamento e conversão de energia, sensores (biossensores e biorreatores) e também como suporte em processos catalíticos (HERBST, 2004). Contudo sua aplicação é limitada pela sua insolubilidade. Todavia, excelentes resultados têm sido obtidos pelo tratamento de nanotubos de carbono com polímeros. Estes trabalhos podem facilitar a aplicação dos nanotubos de carbono como sensor. Suas propriedades mecânicas e elétricas também abrem a possibilidade de adicionar um resultado quantitativo em testes de detecção, exigindo ou não um sistema eletrônico ou conversores adicionais (HAICK, 2013; HERBST, 2004). Estudos mostram a aplicação destes sistemas eletrônicos para quantificação do analito-alvo em testes de diagnóstico rápido (TDRs) (ABERA e CHOI, 2010).

2. JUSTIFICATIVA

Um novo método de dispersão dos nanotubos de carbono que possibilite sua solubilização em água e sua manutenção de dispersão pode abrir novas possibilidades de aplicação destes nanotubos de carbono em imunoenaios, cromatografia e testes moleculares.

Testes qualitativos utilizando nanotubos de carbono para reconhecimento de antígenos maláricos utilizando anticorpos policlonais e monoclonais, anti-HRP2, através do método *lateral flow* pode trazer grandes contribuições futuras no diagnóstico de malária.

Este teste ainda não foi desenvolvido e nenhuma patente foi encontrada em pesquisas recentes (apenas patentes de sistemas similares como WO 2010/059687 A2 e US 2012/0070833 A1, não podendo ser excluída a possibilidade de alguma patente já ter sido depositada, porém não publicada). O sistema proposto ao atingir os objetivos apresenta um grande potencial para futuras publicações científicas. Outros trabalhos podem ser realizados a partir deste como aplicação da técnica de ELISA através de nanotubos de carbono com anticorpos anti-pLHD e anti-HRP2, desenvolvimento e validação de um sistema eletrônico de detecção e o teste comparativo de sensibilidade do sistema tanto *in vitro* quanto com amostra de pacientes com malária, podendo trazer contribuições científicas e tecnológicas significativas.

Este trabalho também abre novas possibilidades de desenvolvimento de outros trabalhos como, por exemplo, utilização de nanotubos de carbono para aplicação em diferentes análises, desde testes de detecção de antígenos em imunoenaios à análise de compostos orgânicos diversos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver de um método de solubilização de nanotubos de carbono e sua aplicação em imunoenaios.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Desenvolver um método de solubilização dos nanotubos, tornando-os aplicáveis em um sistema de fluxo lateral;

Caracterizar os nanotubos de carbono solúveis;

Montar um sistema em fluxo lateral;

Aplicar os nanotubos de carbono em imunoenaios.

4 REVISÃO DA LITERATURA

4.1 NANOTUBOS DE CARBONO

4.1.1 Estrutura dos nanotubos de carbono e suas propriedades

Os nanotubos de carbono, como o próprio nome diz, são materiais em forma de tubo feitos por carbono tendo um diâmetro que é medido em escala nanométrica. Foram descobertos em uma pesquisa com fulereno desenvolvida por Iijima em 1991, no Japão. Os nanotubos de carbono apresentam excelentes propriedades mecânicas, ópticas e eletrônicas. Essas propriedades se tornaram alvo do interesse de muitos pesquisadores e da indústria, sendo consideradas para as mais diversas aplicações, inclusive para fins de detecção. Os nanotubos de carbono (NTC) podem ser visualizados como uma tira de grafeno enrolada formando um cilindro. Estes nanotubos de carbono possuem uma combinação única de rigidez e resistência quando comparados a outros materiais de fibra (HAICK, 2013).

Os nanotubos de carbono de múltiplas paredes (MWCNT) são hoje estruturas bem conhecidas, com diâmetros que variam de dois a centenas de nanômetros e comprimentos de microns. Posteriormente foram produzidos nanotubos de carbono de parede única (SWCNT) contendo apenas um único cilindro de grafite (grafeno). Tanto os nanotubos de carbono de múltiplas paredes quanto os nanotubos de carbono de parede única fazem parte de um grupo de nanotubos coaxiais com diâmetros diferentes (HAICK, 2013; HERBST, 2004).

A respeito de sua constituição, a folha de grafeno pode ser enrolada em ângulos diferentes diretamente relacionados com a estrutura do grafeno. Estas diferentes orientações do rolo de grafeno produzem diferenças na superfície dos nanotubos. Cada orientação apresenta propriedades químicas, ópticas e elétricas únicas. Desta forma, estas propriedades notáveis dos nanotubos de carbono dependem da sua geometria. Já as suas propriedades elétricas dependem do ângulo de torque.

Dependendo desta orientação ao longo do eixo do tubo, o nanotubo de

carbono pode ser melhor condutor do que o cobre, que é normalmente utilizado em fios elétricos e outros materiais. Em outra orientação possível, podem compartilhar propriedades elétricas semelhantes a semicondutores. Os defeitos na superfície dos nanotubos de carbono causados por essa orientação também influenciam a adesão de novos grupos moleculares à parede dos nanotubos de carbono e que podem promover uma nova funcionalização (GONÇALVES, 2013).

Em observação à estrutura do nanotubo, a direção em que a folha de grafeno é enrolada está representada pelo par de índices m e n . Os números inteiros m e n denotam ao número dos vetores unitários m e n ao longo de duas direções na estrutura do cristal de grafeno (formato em favo de mel), como ilustrado na figura 1.

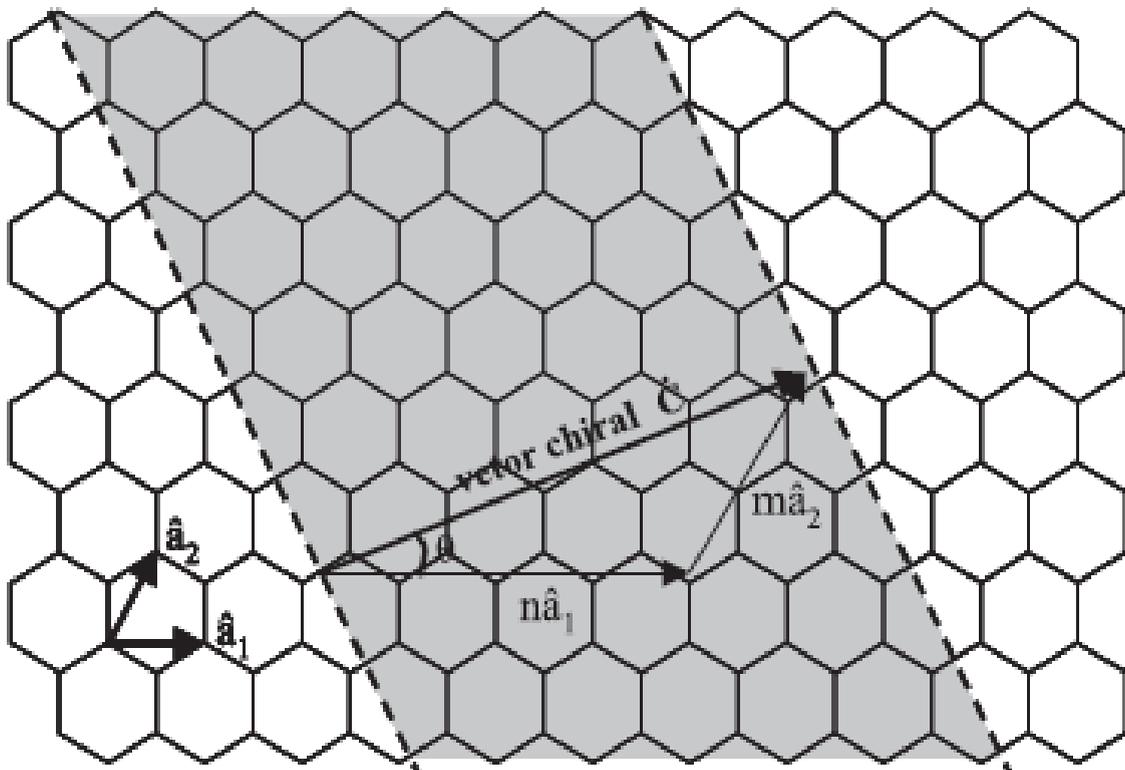


Figura 1: Diagrama da formação de nanotubos de carbono a partir de uma folha de grafite (Herbst, 2004).

O diâmetro e o ângulo *chiral*, ou ângulo de helicidade, definem a maioria das propriedades elétricas e mecânicas dos nanotubos de carbono. O

diâmetro e o ângulo *chiral* resultam dos índices de Hamada (n,m). O vetor C chamado *chiral*, que define a posição relativa de dois sítios é definido por dois números inteiros (m,n) e pelos vetores unitários da rede hexagonal a_1 e a_2 ($C = na_1 + ma_2$) (HERBST, 2004).

Quando m for igual a zero, estes nanotubos são classificados como nanotubos tipo *zig-zag*. Nesta configuração as suas ligações se apresentam paralelamente em relação ao eixo do nanotubo. Quando n for igual a m, os nanotubos de carbono são classificados como nanotubos tipo *armchair*. Nesta configuração, duas ligações do carbono se apresentam perpendiculares em relação ao eixo do nanotubo de carbono. Os nanotubos *zig-zag* e os nanotubos *armchair* são nanotubos aquirais. Quando m é diferente de n e diferente de zero, estes nanotubos são do tipo *chiral*, como mostra a figura 2 (HAICK, 2013 HERBST, 2004).

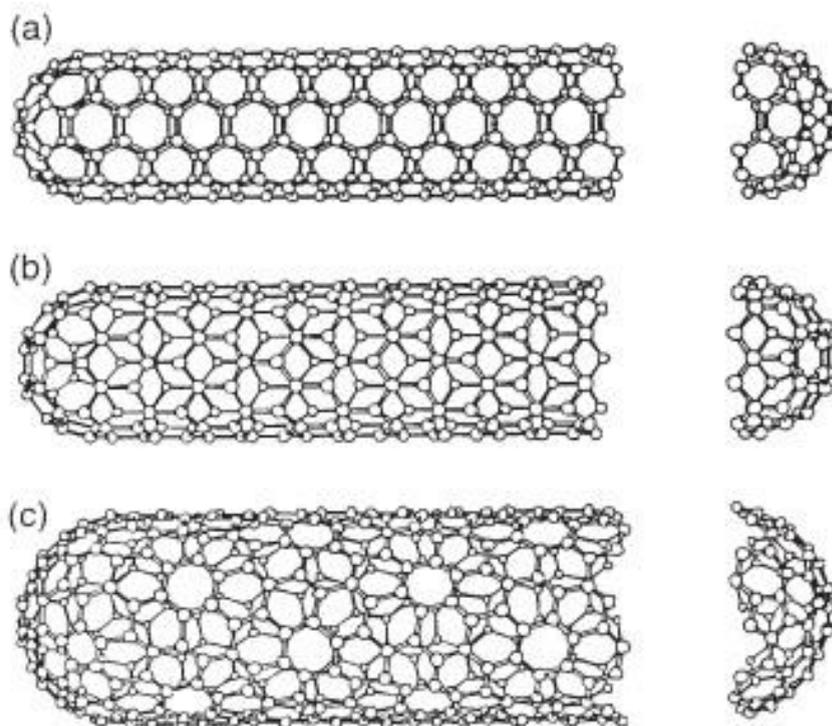


Figura 2: Tipos de nanotubos de carbono e sua respectiva geometria: (a) *armchair*, (b) *zig-zag*, (c) *chiral* (Herbst, 2004).

Além de suas impressionantes propriedades elétricas, os nanotubos de carbono também apresentam propriedades mecânicas especiais. Isso também se deve ao fato de o carbono se ligar a outros carbonos ao longo do tubo por forte ligação química e, graças a essas ligações fortes, a força dos nanotubos de carbono é uma das maiores comparadas aos demais materiais conhecidos. Estes nanotubos de carbono, principalmente os nanotubos de parede simples, são mais rígidos que o aço, sendo muito resistentes contra danos causados por força física.

4.1.2 Dispersão dos nanotubos de carbono

As muitas propriedades relatadas dos nanotubos de carbono dependem da sua geometria. Infelizmente isso também leva a um problema que deve ser solucionado antes das inúmeras aplicações dos nanotubos de carbono. Independente do método de produção dos nanotubos de carbono, muitas populações diferentes são obtidas no final do processo de fabricação. Ao final, é obtida uma mistura de nanotubos com diâmetros, quiralidades e comprimentos diferentes. Para tentar resolver este problema são aplicados mecanismos de pós- triagem, que envolvem nanotubos bem dispersos em um meio (HAICK, 2013; GONÇALVES, 2013).

Depois de sua produção, os nanotubos de carbono podem ser então funcionalizados. O processo de funcionalização visa melhorar sua solubilidade e biocompatibilidade em diversas aplicações, inclusive biomédicas. Os nanotubos de carbono funcionalizados são geralmente utilizados em aplicações biológicas, pois possibilitam que os nanotubos de carbono tenham moléculas aderidas à sua parede. São, portanto, nanotubos de carbono com aplicabilidade em diversas atividades promissoras nas áreas de engenharia química, física, química e biomédica. Nos diversos métodos de funcionalização podem ser utilizados oligonucleotídeos, biomoléculas, surfactantes e polímeros para aperfeiçoar a capacidade de dispersão dos nanotubos de carbono podendo também diminuir sua citotoxicidade (LIU *et al.*, 2014).

Uma boa capacidade de dispersão dos nanotubos de carbono em meio aquoso é um pré-requisito para diversas aplicações práticas dos nanotubos em muitas pesquisas, inclusive a deste projeto. O problema para uma boa solubilização é a agregação de nanotubos de carbono que reduz significativamente as importantes propriedades desses materiais, que são propostas para um único nanotubo. Este problema é maior em nanotubos de carbono de parede única dada a alta extensão de largura (HAICK, 2013).

O problema encontrado na solubilização dos nanotubos em água atua como um dificultador na exploração e análise da sua aplicação em bioanálises, como em testes de detecção de proteínas e drogas em tecido alvo. E não só é importante a obtenção de nanotubos de carbono com boa solubilidade em água, mas também a estabilidade dos nanotubos de carbono nesta dispersão (LIU *et al.*, 2014).

Essa preocupação com a estabilidade dos nanotubos dispersos em água foi demonstrada no estudo de Hong *et al.*, (2005). Após diversas tentativas de solubilização dos nanotubos em água eles alcançaram esta dispersão através da funcionalização dos nanotubos de carbono com o polímero Poli(N- isopropilacrilamida), mas encontrou dificuldades na manutenção desta dispersão, pois o nanotubo funcionalizado obtido apresentou ser muito sensível à mudanças da temperatura da água. Estes nanotubos de carbono quando dispersos em água formam aglomerados quando a temperatura alcança os 35°C.

Outros surfactantes também apresentaram a capacidade de tornar os nanotubos de carbono solúveis em soluções aquosas pela funcionalização destes em sua superfície. Um dos mais estudados são os nanotubos de carbono tratados com polietilenoglicol (PEG) chamados de nanotubos peguilados. Geralmente seu preparo também está associado ao tratamento com ultrassom e centrifugação. A centrifugação dos nanotubos peguilados é uma etapa importante para uma boa solubilização dos nanotubos, isso porque a concentração de PEG livre na solução influencia a dispersão dos nanotubos de carbono em soluções aquosas. Estudos sugerem que diferenças da densidade de PEG na superfície dos nanotubos de carbono interferem diretamente a capacidade de manutenção da sua dispersão (LIU *et*

al., 2014). Pesquisas ainda precisam ser realizadas para o desenvolvimento desta estabilidade química desejável para os nanotubos de carbono solúveis.

4.1.3 Utilização de nanotubos de carbono em testes de detecção

Os nanotubos de carbono possuem importantes características que os tornam atraentes para aplicação em testes de detecção. Eles possuem boa estabilidade ambiental, excelentes propriedades mecânicas, elétricas e uma área excelente de superfície para funcionalizações destes nanotubos. Todas essas características dos nanotubos de carbono o tornam ideal para sua aplicação em sistemas de detecção como, por exemplo, sensores químicos portáteis, compactos, com baixo consumo de energia e de baixo custo (HAICK, 2013).

A utilização de nanotubos de carbono como sensor de detecção não precisa ser aplicado exclusivamente sobre suportes sólidos. Eles também podem ser utilizados em testes flexíveis, podendo ser utilizados em testes para detecção de contaminantes em água, como a detecção de toxinas. Os nanotubos de carbono também têm a capacidade de medir a concentração de determinado analito pela alteração na condutividade. Esta condutividade corresponde à concentração do analito e é uma medição simples de ser realizada. Comparada aos detectores ópticos que costumam utilizar lasers que são mais caros e complicados, esta pode ser uma alternativa promissora do ponto de vista econômico, além de trazer a possibilidade de aumento de sensibilidade na detecção. Estudos com estas estruturas mostraram que a utilização de algumas moléculas ligadas na superfície dos nanotubos podem conduzir a um aumento da corrente, necessitando de mais estudos para uma padronização da técnica (HAICK, 2013; GONÇALVES 2013; HERBST, 2004)

A imobilização de moléculas sob a superfície dos nanotubos de carbono permite que diferentes complexos biomoleculares e diferentes compostos conjugados sejam aplicados em diversas finalidades, como por exemplo, sua aplicação no desenvolvimento de biossensores (HAICK, 2013).

Nanotubos de carbono também podem ser utilizados como nano-absorventes magnéticos para medição da concentração plasmática de fármacos, onde o controle das concentrações plasmáticas é desejável para análise de medicamentos, por exemplo. Em estudo recente, nanotubos de carbono foram usados para determinação da concentração plasmática de metilprednisolona em ratos. Os nanotubos utilizados foram funcionalizados para tal aplicação e neste estudo utilizam-se nanotubos de carbono magnéticos e peguilhados como nano-absorventes para extração em fase-sólida. Estes nanotubos de carbono tratados com polietilenoglicol (PEG) e com magnetitas (Fe_3O_4) ancoradas ao longo da sua superfície se mostraram eficientes para análise da concentração plasmática de metilprednisolona. Os nanotubos de carbono possuem grande área de superfície que permite o carregamento de várias moléculas além de outras propriedades que os tornam mais atraentes que os demais nanomateriais utilizados para este fim (YU *et al.*, 2014).

Por se tratarem de nanopartículas que ao serem funcionalizadas podem ser incorporada em cadeias biológicas, seu uso está sendo testado em estudos desenvolvidos para sua aplicação em testes de detecção de células tumorais e em eventuais aplicações terapêuticas. Estudos buscam uma melhor compreensão do comportamento desses nanotubos de carbono e sua distribuição *in vivo* pelos tecidos. Mesmo estes estudos ainda estando em fase inicial, os resultados encontrados se mostram muito promissores (LIU *et al.*, 2014).

Além dessas aplicações, os nanotubos de carbono também foram testados em fitas imunocromatográficas para testes de detecção. Abera e Choi (2010) descreveram pela primeira vez a aplicação de nanotubos de carbono em substituição ao ouro coloidal na fase móvel de um teste imunocromatográfico. Com resultados promissores, os testes com nanotubos de carbono em imunoensaios encontram-se em pleno desenvolvimento. Buscando superar dificuldades encontradas nos testes de detecção de antígenos, como os encontrados nos testes de diagnóstico rápido (TDRs) de antígenos maláricos, a utilização de nanotubos de carbono representa uma oportunidade de superar os desafios encontrados nos testes de diagnóstico rápido atuais.

4.2 Diagnóstico

Os nanotubos de carbono vêm sendo estudados na otimização de inúmeros processos biotecnológicos, como no desenvolvimento de biossensores para diagnóstico de doenças e medição de concentrações de biomoléculas, sistemas de liberação de fármacos, entre outros (MARTINS, 2011).

O vírus da imunodeficiência humana (HIV) possui um período chamado de janela imunológica, e neste período, testes de diagnóstico comuns não são capazes de detectar a presença de anticorpos contra este vírus. Ao associar nanopartículas de ouro ao nanotubo de carbono de parede múltipla, extrato acetônico de própolis e ao anticorpo anti-p24, formando um nanocompósito, foi possível aumentar a capacidade de detecção do teste. O teste apresentou boa sensibilidade eletroquímica para detecção de até 0,01ng/mL do antígeno no soro (com um limite de detecção relativamente baixo de 0.0064 ng/mL). Este número é aproximadamente 100 vezes maior que os resultados obtidos em testes convencionais de ELISA (*Enzyme Linked Immune Assay*). (KHEIRI *et al.*, 2011).

Em outro estudo, Chaker *et al.*, (2010) buscou desenvolver um imunossensor para detecção e determinação de amilase- α salivar. Utilizando nanotubos de carbono funcionalizados com anti-amilase e depositados alinhados em placa de ouro, formando um eletrodo. Os testes apresentaram resultados relevantes, com limite de detecção em saliva tamponada de 6 ng/mL⁻¹. Este estudo demonstra a aplicação potencial deste nanomaterial no diagnóstico clínico para biomarcadores expressos na saliva humana.

Ainda no campo de imunossensores, outro estudo buscou desenvolver um imunossensor descartável para determinação de prolactina utilizando eletrodos de carbono impresso modificados com nanopartículas de ouro. Os valores obtidos a partir da voltametria de pulso diferencial (DPV) de 1-naftol formado como produtos da reação enzimática da enzima fosfatase alcalina e 1-naftil fosfato permitiu excelente propriedades analíticas em termos de sensibilidade. Os resultados deste estudo evidencia a promissora aplicação de nanotubos de carbono como imunossensor, podendo tornar-se uma

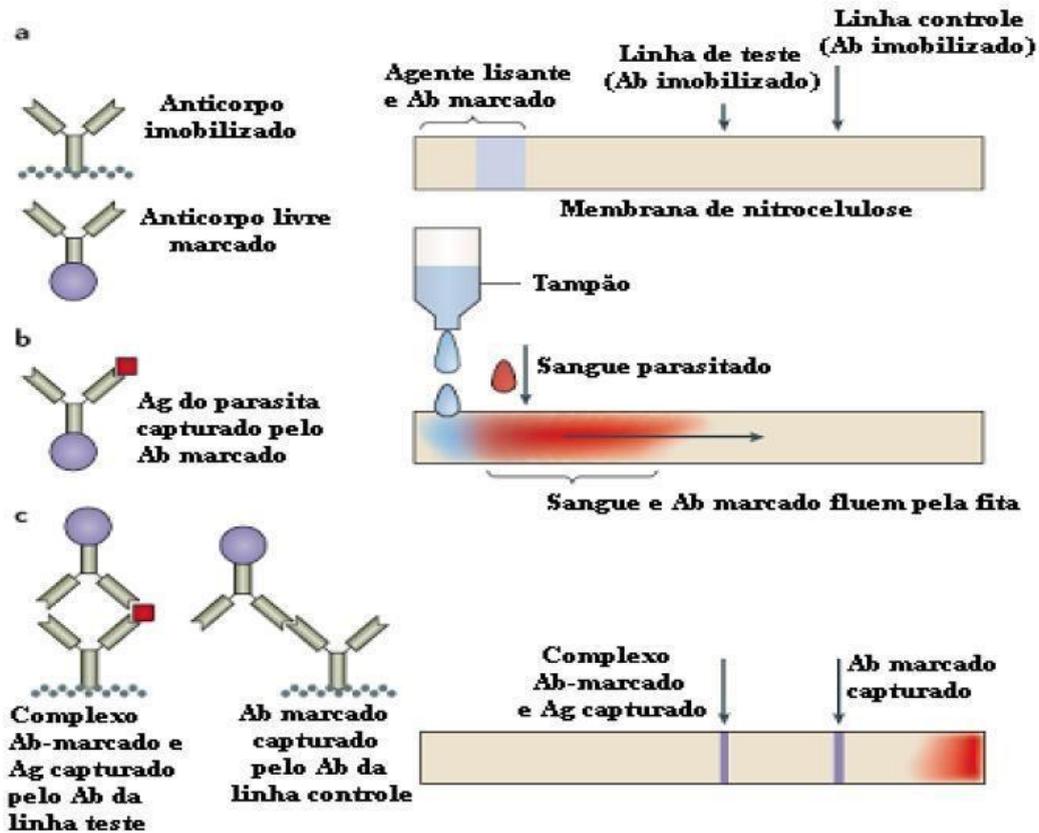
interessante ferramenta analítica para análise de prolactina em amostras clínicas em concentrações relevantes (JANEGITZ, 2012).

Nanotubos de carbono também tem sido estudado no desenvolvimento de novas ferramentas de diagnóstico e também tratamento através de nanotubos de carbono funcionalizados com compostos de interesse no seu interior. Neste estudo foram realizadas funcionalizações nas superfícies externa e interna desses nanotubos, visando desenvolver uma radioterapia voltada contra o câncer. Foram realizados testes com glioblastoma humano primário modificadas para avaliar a eficácia de reconhecimento das células cancerosas pelos nanotubos de carbono. Foi então observado que ele é capaz de se acumular seletivamente dentro das células sem apresentar nenhuma toxicidade. Este estudo demonstra mais uma possibilidade de aplicação biomédica dos nanotubos de carbono em testes de detecção e tratamento do câncer (SPINATO, *et al.*, 2016).

Dado as propriedades características encontradas nos nanotubos de carbono, estudos têm buscado sua aplicação em testes imunocromatográficos. Em um destes estudos, os nanotubos de carbono foram aplicados em substituição ao ouro coloidal (ABERA e CHOI, 2010). Como exemplo de teste imunocromatográfico figuram os testes de detecção rápida (TDRs). Os TDRs utilizam anticorpos para detectar um ou diversos antígenos presentes na amostra.

Geralmente para iniciar um teste de detecção rápida, realiza-se a punção digital, geralmente com 5 μ L, colocada com auxílio de pipeta no poço de amostra do dispositivo. A amostra flui por capilaridade através de membranas porosas, saindo da zona de aplicação onde estão, geralmente, nanosensores como o ouro coloidal ou nanopartículas de carbono, acoplado com anticorpos monoclonais ou policlonais, fluindo até uma zona de reação, onde o antígeno é detectado. Na zona de reação também está à linha controle que contém anticorpos que reconhecem os anticorpos da fase móvel do teste (na zona de aplicação), validando o teste (Figura 3. A) (ABERA e CHOI 2010; NOGUEIRA, 2009; NOGUEIRA *et al.*, 2011).

A



B

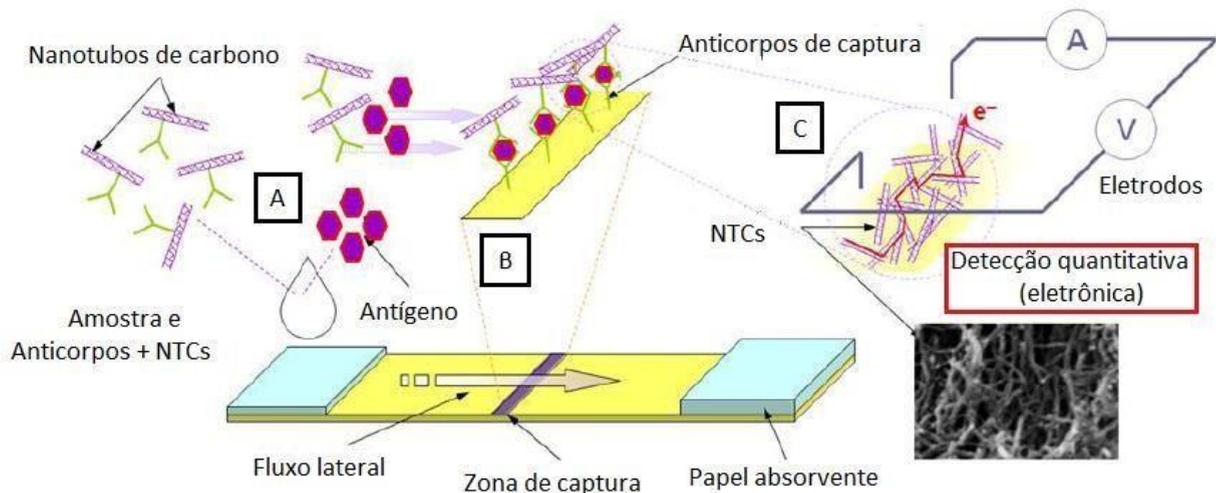


Figura 3 : Testes imunocromatográficos. **A** – Sistema de detecção utilizado nos TDRs tradicionais (modificado de BELL e PELLING, 2006); Ab = anticorpos; Ag = antígeno. **B**- Sistema de detecção proposto neste projeto para detecção de antígenos da malária utilizando NTCs (modificado de ABERA e CHOI, 2010); A (circulado) = corrente elétrica (amper); V (circulado) = volts; NTCs = nanotubos de carbono.

A aplicação de nanotubos de carbono em um teste imunocromatográfico foi descrito pela primeira vez por Abera e Choi (2010) (Figura 3.B). O uso de nanotubos de carbono em substituição ao ouro coloidal pode superar dificuldades encontradas nos TDRs comerciais dada a sua resistência mecânica, térmica e capacidade de manutenção da condutividade após a realização de testes. Podendo futuramente adicionar um resultado quantitativo aos testes rápidos (ABERA e CHOI, 2010; ODOM *et al.*, 1998; LIANG *et al.*, 2002; ROBERTSON *et al.*, 1992). Não excluindo a possibilidade de aumento da sensibilidade e capacidade de detecção em amostras menos invasivas, como a saliva do paciente (CHAKER, *et al.*, 2010).

O uso de nanotubos de carbono em substituição ao ouro coloidal em estudos de detecção de antígenos maláricos não foi descrita até o momento. Estudos buscando sua aplicação para TDRs de diagnóstico de malária podem trazer melhorias frente às limitações já descritas na literatura destes testes no diagnóstico de malária.

No diagnóstico de malária, a Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda que toda pessoa com suspeita de malária seja examinada, seja por microscopia através da busca de parasitas no sangue periférico ou pela aplicação de testes de diagnóstico rápido (TDRs) (WHO, 2014). A associação dos sintomas clínicos em paciente oriundo de área malarígenas é muito importante, mas por si só não é preciso devido à similaridade com outras síndromes febris agudas e indica, obrigatoriamente, a solicitação do exame laboratorial confirmatório da infecção. O diagnóstico definitivo de malária é feito pelo exame microscópico do sangue do paciente para detecção e diferenciação das espécies de plasmódios (BRASIL, 2008). Casos suspeitos sejam investigados através um teste rápido imunocromatográfico ou pelo diagnóstico microscópico do sangue, detectando a presença do parasito ou um de seus componentes. (WHO, 2013).

A técnica de diagnóstico considerada padrão ouro e mais amplamente utilizada é a da gota espessa, pois a concentração do sangue por campo microscópico facilita o encontro do parasita. A gota espessa é corada pela técnica de Walker (azul de metileno e Giemsa) e o esfregaço

delgado é corado pelo Giemsa. Esta técnica é de baixo custo e permite verificar a espécie do plasmódio. Também é possível realizar a quantificação da intensidade do parasitismo. (BRASIL, 2008). Entretanto, requer um profissional bem treinado na leitura das lâminas para diagnóstico, principalmente em casos de baixa parasitemia e em casos de infecção mista, quando há mais de uma espécie de plasmódio. (PAYNE, 1988).

No Brasil, a região Amazônica (estados do Amazonas, Acre, Amapá, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins) concentra a maioria dos casos de malária no país. Em 2014 foram registrados 143.552 casos de malária nesta região. O estado do Amazonas foi o que mais contribuiu no número de casos, com 47% dos casos. No ano de 2015, foram registrados 75.755 casos, um aumento de 10,63% nos casos registrados em 2014. O Brasil possui uma ampla rede de diagnóstico de malária. Somente no ano de 2015 foram realizados mais de 1.509.000 de exames. Destes, 143.647 positivos para a doença (SIVEP, 2015; SIVEP, 2016).

A maior região endêmica no Brasil, a região amazônica, possui extensas áreas de acesso remoto e de difícil acesso. Alguns deles não há profissionais treinados para diagnóstico através da microscopia. Nestes casos, os testes imunocromatográficos se tornam uma opção simples e rápida para o diagnóstico qualitativo da malária. Entretanto, estes testes não podem informar o grau de parasitemia do paciente além de apresentar variação na sensibilidade quando a densidade parasitária é baixa. A OMS recomenda que testes imunocromatográficos apresentem sensibilidade superior a 95% quando comparada com a microscopia. Devendo detectar com 100% de sensibilidade casos com 0,002% parasitemia (100 parasitos/ μ L) (HOUZÉ, 2013; MOUATCHO e GROLDING, 2013; WHO, 2013).

Na maioria dos TDRs utilizados para detecção de malária a técnica utilizada é a imunocromatográfica com anticorpos monoclonais conjugados. Capazes de detectar pequenas quantidades do antígeno no sangue, os antígenos-alvo usualmente utilizados e de maior interesse são direcionados para detecção da Proteína 2 rica em histidina (HRP-2) do *Plasmodium falciparum*, na lactato desidrogenase parasito-específica (pLDH) ou na aldolase, sendo que as duas últimas estão presentes no processo glicolítico do parasito e em todas as espécies (OLIVEIRA, 2009).

Os antígenos alvo de um TDR comercial são HRP-2 e pLDH. A proteína hidrossolúvel HRP-2 é produzida pelos trofozoítos e gametócitos jovens de *Plasmodium falciparum*. Estes testes detectam apenas HRP-2 de *Plasmodium falciparum*, mas alguns destes testes tem aldalose conjugada. O que aumenta o diagnóstico para detecção de outras espécies de plasmódio. Outros testes utilizam como alvo a enzima glicolítica pLDH, produzida principalmente nos estágios assexuados dos parasitos e em menor quantidade nos estágios sexuados. Estes testes permitem diferenciar infecções de *Plasmodium falciparum* das espécies não-*falciparum* (BARBER, 2013; MOODY, 2002; OLIVEIRA, 2015).

Os TDRs para diagnóstico de malária existem testes que utilizam um ou os dois antígenos-alvo já citados. Os que utilizam os dois funcionam geralmente como um teste combinado que utiliza os dois anticorpos monoclonais/policlonais com duas linhas separadas em faixas diferentes. Um anticorpo monoclonal/policlonal (linha 2) pode ser pan específico para lactato desidrogenase (pLDH) capaz de detectar infecções causadas por *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malarie*, *P. ovale*) e outro anticorpo monoclonal/policlonal específico para detecção de HRP-2 das espécies de *Plasmodium falciparum* (linha 1). Todos possuem uma linha controle que sempre deve aparecer para validar o teste.

A qualidade dos TDRs atuais é testada desde 2008 pela OMS. Em uma análise de qualidade realizada em 2013, a maioria dos produtos tinha alta taxa de detecção de *P. falciparum* em densidades parasitárias de 2000 parasitas por microlitro. O mesmo ocorreu com a maioria dos produtos para *P. vivax*. Entretanto, em baixa densidade parasitária (200 parasitas por microlitro) somente 76% dos produtos para *P. falciparum* e 42% de *P. vivax* demonstraram níveis de detecção aceitáveis (WHO, 2014).

Os TDRs, apesar de serem uma alternativa rápida e viável, também apresenta desvantagens como variação de sensibilidade de acordo com a região geográfica baixas parasitemias, falsos negativos podem ocorrer em testes que utilizam HRP-2 como antígeno alvo dada a deleção do gene que codifica para este antígeno em determinadas cepas de *P. falciparum* e também por não permitir uma medição da parasitemia, não sendo possível melhor auxiliar no prognóstico e eficácia terapêutica (IQBAL et al., 2004;

NOGUEIRA, 2009). Além disso, a OMS recomenda que esses testes sejam capazes de suportar temperaturas de 40 à 50°C e não requerer refrigeração, situação climática comum nas zonas malarígenas no mundo. Entretanto, estas partículas (ouro coloidal) apresentam variação na estabilidade quando comparada a 4°C. (MARIUBA, 2010; WHO, 2008; WONGSRICHANALAI *et al.*, 2007; NOQUEIRA, 2009).

Com o desenvolvimento de nanotubos solúveis, aplicáveis para detecção de patógenos em imunoenaios, este estudo visa trazer contribuições para futuros estudos de desenvolvimento um teste rápido de detecção de antígenos maláricos ou de detecção de outras biomoléculas.

Esta metodologia de solubilização de nanotubos de carbono aplicada em sistemas imunocromatográficos traz contribuições para futuros estudos no desenvolvimento de um sistema de detecção que utiliza nanotubos de carbono para a detecção de patógenos, como antígenos maláricos testados neste trabalho que associados a sistemas eletrônicos podem trazer um resultado quantitativo aos TDRs. Não descartando a possibilidade de melhorar a sensibilidade do teste.

Logo, este projeto teve por objetivo desenvolver uma metodologia de solubilização de nanotubos de carbono aplicáveis a imunoenaios. Estes nanotubos foram aplicados em sistema em fluxo lateral mostrando resultados promissores. Utilizamos anticorpos policlonais e monoclonais anti-pLDH e anti-HRP2 através do método de *lateral flow* capaz de detectar os antígenos na linha teste. Este estudo visa superar as dificuldades descritas quanto a aplicação de nanotubos de carbono em bioensaios pela dificuldade de sua solubilização e estabilidade química para manutenção desta dispersão. Com o desenvolvimento destes nanotubos solúveis, estudos posteriores poderão aplicar esta nova metodologia para o desenvolvimento de um TDR para detecção de antígenos.

O grupo “Doenças infecciosas na Amazônia, diagnóstico e controle” (com sede no Instituto Leônidas e Maria Deane / Fundação Oswaldo Cruz) vem trabalhando há alguns anos na produção de TDRs, já obtendo as proteínas recombinantes dos antígenos marcadores de infecções maláricas (Lactato desidrogenase, pLDH; “Proteína 2” rica em Histidina, HRP2)

produzidas, anticorpos policlonais validados contra estas proteínas, anticorpos monoclonais em etapa de validação e competência na construção de sistemas em fluxo lateral (testes imunocromatográficos) obtida em trabalhos anteriores (MARIÚBA, 2010). Este projeto contou ainda com o laboratório de química da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), o qual realizou boa parte das análises para caracterização das nanopartículas.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Preparo dos nanotubos de carbono

5.1.1 Preparo de acordo com a metodologia descrita por Abera e Choi (2010), com alterações.

Para realizar o acoplamento dos anticorpos policlonais (obtidos em trabalhos anteriores) anti-LDH e anti-HRP2, foi seguido o método descrito por ABERA e CHOI (2010), com alterações. Resumidamente, uma amostra de nanotubos de carbono ("Multi walled carbon nanotubes", diâmetro externo = 8-15 nm, tamanho =10-15 μm , pureza > 95 wt %, fornecido pela empresa Cheaptubes) foi preparada a 0.1 mg/ml. Nesta amostra, os NTCs foram tratados com o surfactante polivinilpirrolidona (PVP) em solução aquosa. A solução foi submetida a uma sonicação em baixa potencia. Este surfactante quando absorvidos pela superfície dos NTCs, proporcionam uma cobertura parcial.

Os NTCs então reagiram com EDC (1-(3-(dimethylamino)-propyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride) (0.4 M) e Sulfo-NHS (0.1 M) em tampão PBS (pH ~ 6.0) para ativar a ligação covalente entre o grupo carboxi (-COOH) dos NTCs e as aminas primarias (-NH₂) dos anticorpos. Após, os anticorpos anti-HRP2 e anti-pLDH foram adicionados (em amostras separadas, em 0.01 M fosfato de sódio, 0.15 M NaCl, pH 7.4, 15 mM azida sódica) à solução de NTCs o que resultará na sua imobilização nos sítios não cobertos pelo surfactante. A cobertura parcial do surfactante é essencial tanto a dispersão quanto para o bloqueio da superfície dos NTCs contra interações não desejadas com outras proteínas.

5.1.2 Preparo dos nanotubos de carbono segundo a metodologia de Xue *et al.*,(2008)

Para preparar MWCNTs solúveis em água, os MWCNTs foram primeiramente tratados com persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$) em solução diluída de ácido sulfúrico (H_2SO_4). Uma amostra de 100 mg de MWCNTs foi dispersa em 75 ml de $K_2S_2O_8$ aquoso (0,2 M) por ultrassons. Após adição de 12,5 ml de H_2SO_4 a 98%, a mistura foi agitada magneticamente durante 24 h a 60 ° C. A mistura reacional foi arrefecida e o processo de decantação-dispersão foi repetido até o valor de pH da suspensão ter atingido 6-7. Após filtração com um microfilme de 0,22 μm , o resíduo de filtração foi seco; Assim foram obtidos MWCNTs tratados com $K_2S_2O_8$. Em seguida, 100 mg de MWCNTs tratados com $K_2S_2O_8$ foram adicionados em 100 mL de solução de poli (estireno-co-anidrido maleico) hidrolisado (HSMA) a 0,1% em água. A mistura foi sonicada durante 0,5 h e a mistura bem dispersa foi centrifugada a 16 000 rpm durante 2,5 h. O centrifugado foi cuidadosamente decantado. O sedimento assim obtido foi de novo disperso numa solução de 100 ml de HSMA a 0,1% por ultrassom e depois submetido a centrifugação adicional. Depois do processo de dispersão-centrifugação ter sido repetido durante 10 ciclos, todos os decantados 1-10 dos ciclos 1-10 foram pesados e filtrados com membranas de 0,22 μm ; Depois o resíduo de filtração foi seco, dando HSMA-MWCNTs solúveis em água.

5.1.3 Preparo dos nanotubos de carbono segundo a metodologia desenvolvida neste trabalho

Foram pesados 50 mg de nanotubos de carbono de múltipla parede COOH ("Multi walled carbon nanotubes" COOH, diâmetro externo = 8-15 nm, tamanho =10- 15 μm , pureza > 95 wt %, fornecido pela empresa Cheaptubes) e misturado em 9 mL de tampão fosfato salino (PBS) 1X. Para o preparo de 100 mL de PBS 1X foram pesados 0,8g de Cloreto de sódio (NaCl), 0,02g de

Cloreto de potássio (KCl), 0,144 g de Fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4), 0,024g de Fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) e misturados em 100 mL de água MilliQ. Após isso, o pH foi ajustado para 7,2 e solução foi autoclavada por 15 minutos.

Para o preparo de polivinil pirrolidona (PVP) foi pesado 1,2 g de PVP e diluído em 10 mL de água MilliQ (concentração final de 120mg/mL). Em seguida, foi adicionado 1 mL de PVP (120mg/mL) em 9 ml da solução de PBS 1X e nanotubos de carbono de múltipla parede (NTCMP). A solução foi submetida à dispersão por sonicação utilizando o processador ultrassônico UP100H da Hielscher em amplitude de 100% durante 30 minutos, com pulso de 1 segundo e intervalo de 1 segundo. Após a sonicação, o NTC foi submetido a centrifugação a 16.000 rpm por 30 minutos (Centrífuga 5417 C, Eppendorf). O primeiro sobrenadante foi descartado e ao precipitado restante foram adicionados 9 mL de PBS 1X e 1mL de PVP (120mg/mL) sendo submetido a sonicação por 30 minutos. Após a sonicação, o NTC foi centrifugado e o sobrenadante conservado em outro recipiente. O precipitado restante foi ressuspendido em 9 mL de PBS 1X e 1 mL de PVP, seguido novamente de sonicação e centrifugação nas especificações descritas anteriormente. Foram realizados 10 ciclos de sonicação/centrifugação. Os sobrenadantes dos ciclos 2 a 10 foram conservados. Estes foram reunidos em um único volume e filtrado em membrana filtrante de 0,22 μm (tipo HAWP 47mm, Millipore). O NTCMP solubilizado foi armazenado. Os ciclos de sonicação e centrifugação podem ser vistos na Figura 4.

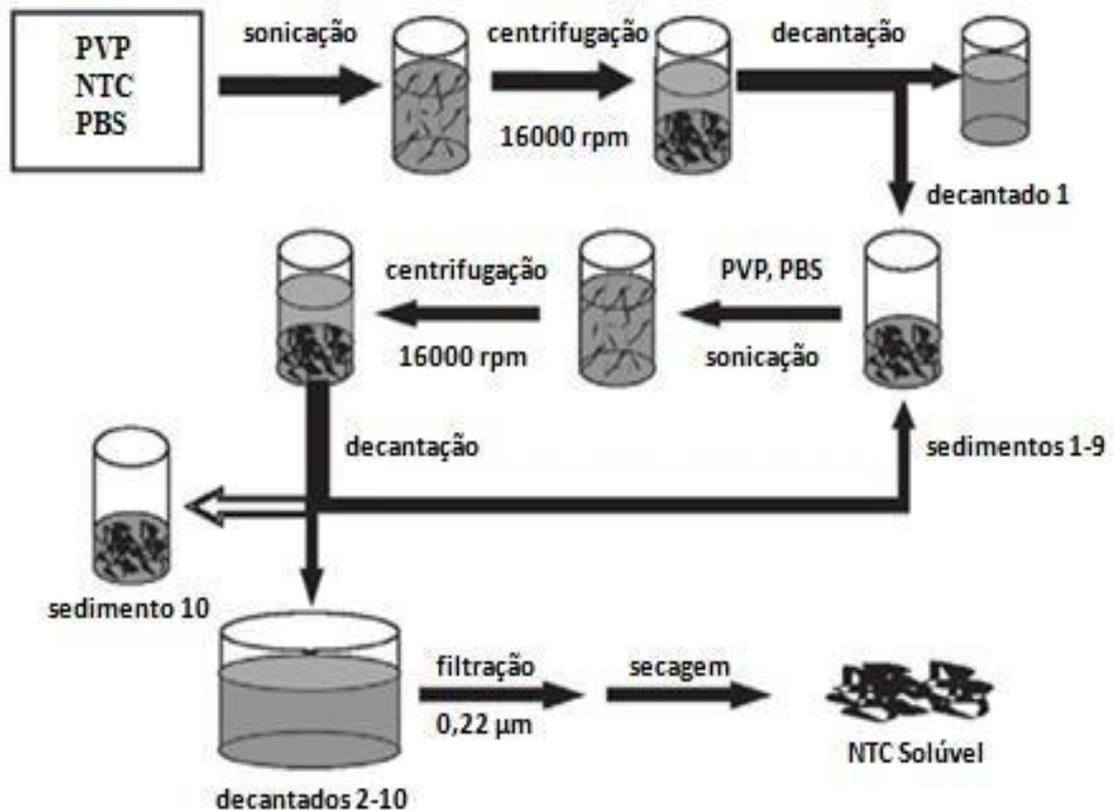


FIGURA 4: Fluxograma esquemático dos ciclos de sonicação – centrifugação para obtenção de NTCs solúveis em água (Adaptado de XUE *et al.*, 2008).

5.2 Funcionalização dos nanotubos de carbono

Para realizar o acoplamento dos anticorpos, 5 μL de EDC (1-(3-(dimethylamino)-propyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride) (0,4 M) e 5 μL Sulfo-NHS (Sulfo-N-hidroxisucinimida) (0,1 M) foram adicionados em uma amostra de 1 mL do NTCMP solubilizado. A amostra foi submetida à agitação leve de 350 rpm por uma hora a 18°C em um shaker (Thermomixer Comfort, Eppendorf) e posteriormente armazenada a 4°C por 24 horas. Após isso, foram preparadas 10 amostras de 100 μL de NTC ativado com EDC e Sulfo-NHS. Em cada amostra foi adicionado 1 μL (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) do anticorpo anti-Rabbit. As amostras foram submetidas à agitação leve de 350 rpm a 18°C no shaker por uma hora. Em seguida, as amostras foram armazenadas a 4°C por 24 horas.

5.3 Montagem do sistema imunocromatográfico

Para a montagem do sistema imunocromatográfico, fitas de 0,5 cm de cartões com membrana “Hiflowplus” (Tipo HF 135 6 cm x 30cm, Millipore) foram colocadas em contato com tampão 1 (Tris HCl , 0,1 M; 0,4% de Glicerina pura) por 15 minutos e deixadas para secar a 37 °C por 16 horas. As fitas tratadas com o tampão 1 foram sensibilizadas com anticorpo de coelho na linha teste (3µg/µL), na altura de 3,7 cm partindo da porção inferior da fita, utilizando o dispensador Linomat IV da empresa CAMAG. Após este procedimento, as fitas foram deixadas para secar a 37°C por 2 horas. Em seguida, as membranas foram bloqueadas por 30 minutos com o tampão 2 (PBS 1X a 0,25% de BSA e 0,05% de Tween 20) seguida de 5 lavagens com tampão 3 (PBS 1X a 0,05% de Tween 20) e foram deixadas para secar a 37°C por 16 horas. Foram colocados 20 µL de nanotubos de carbono funcionalizados com anticorpo anti-coelho em uma fibra de vidro (0,3 cm x 0,5 cm). Após isto, a fibra de vidro com o NTC foi deixada para secar a 37°C por 2 horas.

Para a montagem do sistema em fluxo lateral uma membrana absorvente foi colada na porção adesiva superior da membrana. Na porção adesiva inferior, foram coladas uma membrana absorvente e uma fibra de vidro com o NTC funcionalizado com anticorpo. A fibra de vidro foi colada entre a membrana de nitrocelulose e a membrana absorvente, estando em contato com as duas estruturas. Com a montagem do sistema concluída, a membrana absorvente da porção inferior foi colocada em contato com um tampão de corrida (PBS 1X). Neste sistema a membrana porosa impulsiona o fluxo do tampão por capilaridade até a membrana absorvente na outra extremidade da fita, passando pela fibra de vidro e despreendendo os nanotubos de carbono funcionalizados. Ao fluírem pela membrana de nitrocelulose os nanotubos de carbono funcionalizados foram reconhecidos pelos anticorpos de captura imobilizados na linha teste (Figura 7). Este reconhecimento gerou um sinal visual caracterizado pela formação de uma banda na linha de teste.

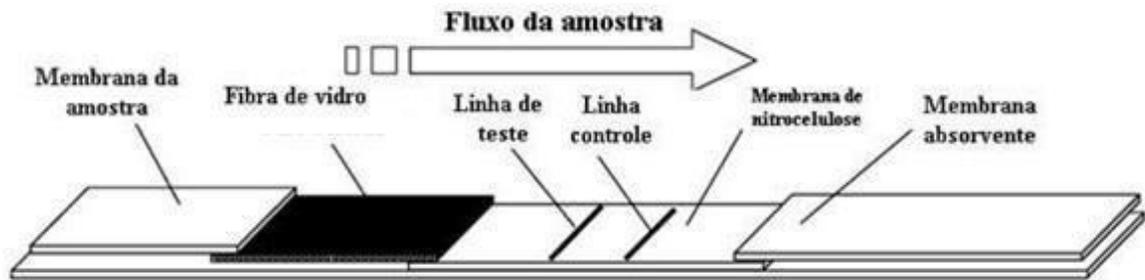


Figura 5: Esquema da distribuição das membranas absorventes, fibra de vidro e membrana de nitrocelulose após a montagem do sistema em fluxo lateral.

5.4 CARACTERIZAÇÃO DOS NANOTUBOS DE CARBONO SOLÚVEIS

5.4.1 Espectroscopia Raman

A espectroscopia Raman é uma técnica espectroscópica que visa medir a identidade química e a estrutura de um material. Esta técnica apresenta uma alta especificidade química e é comumente utilizada para diferenciar diversos componentes do mesmo material, por exemplo. Quando empregada em conjunto com outras técnicas de caracterização, se torna uma excelente maneira de medir a identidade química de partículas individualmente dispersas dentro de uma amostra (FARIA *et al.*, 1995; FARIA *et al.*, 1997).

Esta técnica usa uma fonte monocromática de luz a qual, ao atingir o objeto, é espalhada por ele gerando luz de mesma energia ou de energia diferente da incidente. Quando a luz gerada é de mesma energia, o espalhamento é chamado de elástico e não é de interesse, mas no segundo caso, quando a luz é de energia diferente, o espalhamento é chamado de inelástico. E a partir dessa diferença de energia é possível descobrir informações relevantes da composição química do material analisado. Este fenômeno foi então chamado de efeito Raman (FARIA *et al.*, 1995; FARIA *et al.*, 1997).

Não existindo um só tipo de vibração, a radiação espalhada inelasticamente é composta por um número não muito grande de frequências (componentes espectrais) que precisam ser separadas e ter sua intensidade medida. A representação da intensidade de radiação espalhada resulta em um gráfico onde observa-se o espectro Raman. Assim sendo, cada componente químico, seja um surfactante, substrato ou outro espécie químico apresenta um espectro que funciona como uma impressão digital, permitindo sua identificação (Figura 4) (FARIA *et al.*, 1997).

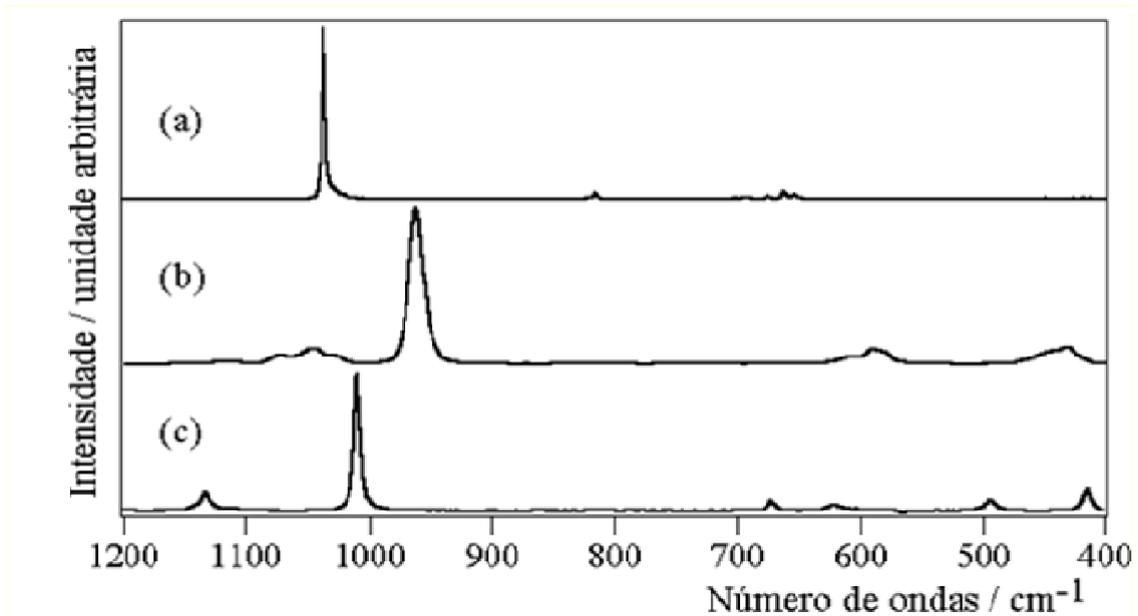


Figura 6:- Exemplo do uso da Espectroscopia Raman na identificação de substâncias. Os espectros mostrados são todos de pigmentos brancos: (a) branco de chumbo (carbonato de chumbo); (b) branco de ossos (fosfato de cálcio) e (c) gipsita (sulfato de cálcio hidratado) (FARIA, *et al.*, 1997)

Para a obtenção dos espectros Raman, 30 μ l de todas as amostras foram gotejados sobre lâminas de vidro revestidas com ouro previamente limpas e foram secas ao ar. As amostras foram focalizadas com um microscópio ótico acoplado ao espectrômetro Raman e os espectros foram obtidos com uma média de cinco varreduras usando um laser de argônio (3,65mW).

5.4.2 Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-Vis)

A espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) é uma técnica utilizada para se obter o espectro de absorção de compostos orgânicos e inorgânicos. A Lei de Lambert-Beer é o princípio da espectroscopia de absorção e permite determinar quantitativamente a concentração de substâncias em uma solução (GONÇALVES, 2013). A região do espectro do ultravioleta encontra-se na faixa de 200~400 nm e a

região visível de 400 a 800 nm. O UV-Vis foi empregado com o intuito de analisar a capacidade de dispersão do surfactante (PVP utilizado neste trabalho na preparação dos nanotubos de carbono solúveis) e da técnica utilizada no processo de solubilização dos nanotubos que incluem ciclos de sonicação e centrifugação.

As medições de absorção no UV-Vis foram realizadas na gama de 190-1100 nm, utilizando um espectrofotômetro Genesys 10S (Thermo Scientific®). As amostras foram diluídas resultando em um teor de MWCNTs que foi adequado para as análises das amostras aquosas por UV-VIS.

5.4.3 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIV)

Variação da técnica de espectroscopia no infravermelho (IRS), onde é utilizado dois feixes de radiação eletromagnética para se obter um interferograma. Nesta técnica, um sinal é gerado através da mudança do caminho óptico entre os dois feixes utilizados. Através de cálculos matemáticos, aplica-se a transformada de Fourier onde a distância do comprimento óptico pode ser convertida para o valor de frequência de radiação e vice-versa. Através deste cálculo, a informação de um interferograma é decodificada (Figura 5).

A utilização deste cálculo, a transformada de Fourier, permite um significativo aumento de sensibilidade e velocidade à análise de espectroscopia de infravermelho. Este cálculo é realizado em computador, devendo o sinal ser digitalizado (GONÇALVES, 2013; FORATO *et al.*, 2010).

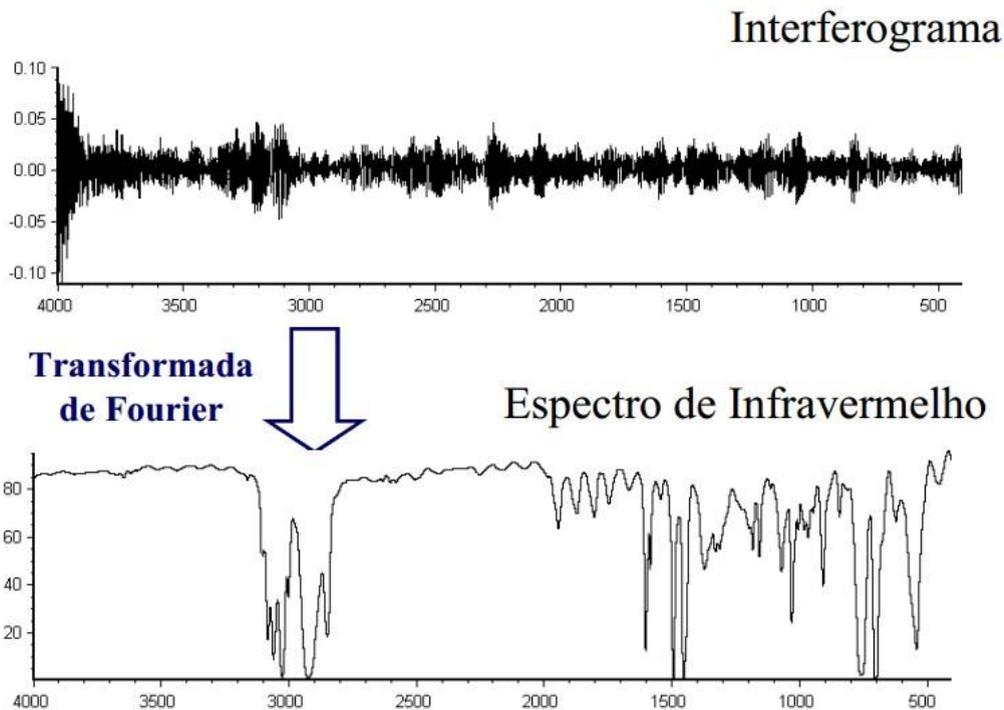


Figura 7 : Espectro de infravermelho antes e depois da aplicação do cálculo da transformada de Fourier (GONÇALVES, 2013).

Análises de infravermelho foram realizadas em pastilhas de KBr na faixa de $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$, usando um espectrofotômetro Nicolet iS10 (Thermo Scientific®).

5.4.4 Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo baseia-se no emprego de radiação laser, fluxo hidrodinâmico, ótica, substâncias fluorescentes (fluorocromos), recursos de informática e é empregada para determinação de certas características estruturais e funcionais de partículas em suspensão (BRAGA *et al.*, 2016).

Os citômetros de fluxo têm por princípio básico aspirar células ou partículas em suspensão e forçá-las a passar por uma câmara especial fazendo com que as células ou partículas fluam em fluxo contínuo e saiam desta câmara em sequência para que seja detectada pelo laser uma célula por vez. Dois fenômenos físicos ocorrem neste processo, no primeiro uma parte da luz é espalhada (*scatter*) de acordo com características morfológicas e estruturais. O *Forward Scatter* (FS) está relacionado ao tamanho da partícula ou célula. O *Side Scatter* (SS) está relacionado a complexidade ou granulosidade da célula ou partícula (BERTHO, [entre 2001 e 2004]; BRAGA *et al.*, 2016).

O segundo fenômeno ocorre com as células ou partículas coradas com fluorocromos que emitem luz de acordo com suas características fluorescentes, sendo utilizadas para analisar características químicas, biofísicas e moleculares das células ou partículas. Seis parâmetros são considerados básicos e podem ser medidos simultaneamente, são eles: tamanho celular (FS), granularidade interna das células (SS), fluorescência verde (FL1), fluorescência amarela (FL2), fluorescência laranja (FL3), fluorescência vermelha (FL4) e fluorescência roxa (FL5) (BERTHO, [entre 2001 e 2004]; BRAGA *et al.*, 2016).

Neste trabalho a técnica foi utilizada para investigação dos efeitos dos componentes utilizados na solubilização dos nanotubos de carbono, identificação dos componentes distintos de MWCNTs e avaliar o acoplamento dos nanotubos de carbono.

Foram avaliadas as medidas morfométricas dos nanotubos de carbono por citometria de fluxo, determinando seu tamanho e complexidade, além da intensidade de fluorescência de anticorpos monoclonais de camundongos conjugados ao fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC), utilizando o citômetro de fluxo FACS canto II da plataforma de Citometria de fluxo do Instituto Leônidas e Maria Deane, FIOCRUZ-AM. As análises de porcentagem de eventos foram realizadas pelos programas FACS Diva Software versão 6.1.2 e os gráficos foram analisados pelo programa Flow-Jo versão 5.6.7.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 PREPARAÇÕES DOS NANOTUBOS DE CARBONO

6.1.1 Testes de solubilidade e fluxo em *lateral flow* de NTCs preparados segundo a metodologia de Xue et al.,(2008)

Os testes com NTCs preparado segundo a metodologia proposta por XUE *et al.*, (2008), não apresentaram fluxo no sistema em fluxo lateral em nenhuma das formas testadas. No teste de secagem e ressuspensão em água também foi observada presença de precipitação.

6.1.2 Testes de solubilidade e fluxo em *lateral flow* de NTCs preparados segundo a metodologia descrita por Abera e Choi (2010), com alterações.

Também foi testada outra metodologia de preparo de nanotubos para aplicação em sistemas de fluxo lateral. Para isso, foram realizados diferentes ensaios com metodologia de preparo. Os ensaios foram iniciados pela etapa de funcionalização dos nanotubos de carbono com os anticorpos policlonais anti-HRP2 de acordo com a metodologia proposta por ABERA e CHOI (2010), com alterações.

Logo após a obtenção destes nanotubos, métodos de bloqueio por BSA foram testados para prevenir interações não específicas. Neste experimento, essas interações foram investigadas por testes de controle da corrida, com NTC parcial e totalmente funcionalizados em um ensaio imunocromatográfico competitivo.

Primeiramente, uma amostra com NTCs tratados com polivinilpirrolidona (PVP) e submetidos a uma sonicação em baixa potência foi aplicada na fita imunocromatográfica com anticorpo imobilizado. Nesta fita não houve ligação inespecífica entre os nanotubos de carbono e o anticorpo

(controle negativo). Na segunda fita, a amostra de NTC funcionalizado e acoplado ao anticorpo anti-HRP2 foi aplicada na fita imunocromatográfica com anticorpo imobilizado, nesta fita houve formação da banda na zona de captura (Figura 8).

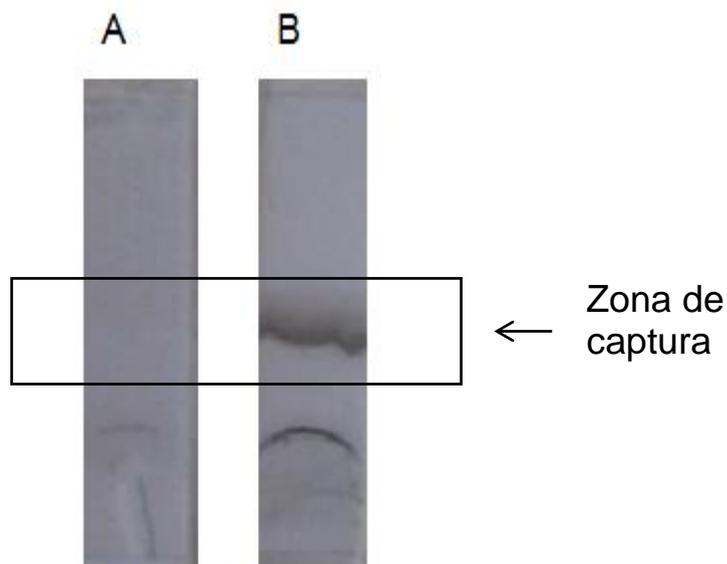


Figura 8: Testes de corrida em fluxo lateral – Na primeira fita (A) o controle negativo. Observa-se que não há formação de banda na zona de captura. À direita (B), o ensaio com aplicação do NTC acoplado e a formação da banda na zona de captura.

Num segundo experimento, foi adicionada a fase móvel (NTC acoplado ao anticorpo) o mesmo anticorpo presente na fita imunocromatográfica, em duas condições: 5 e 10 μg . Foi observado neste experimento que quanto maior a quantidade de anticorpo adicionado ao NTC acoplado, menos visível ficava a formação da banda na zona de captura (Figura 9). Isso porque os sítios de ligação dos anticorpos acoplados no NTC já haviam se ligado aos anticorpos de captura adicionados na fase móvel do teste, antes da sua aplicação no sistema em fluxo lateral. E é proporcional à quantidade de

anticorpo adicionado.

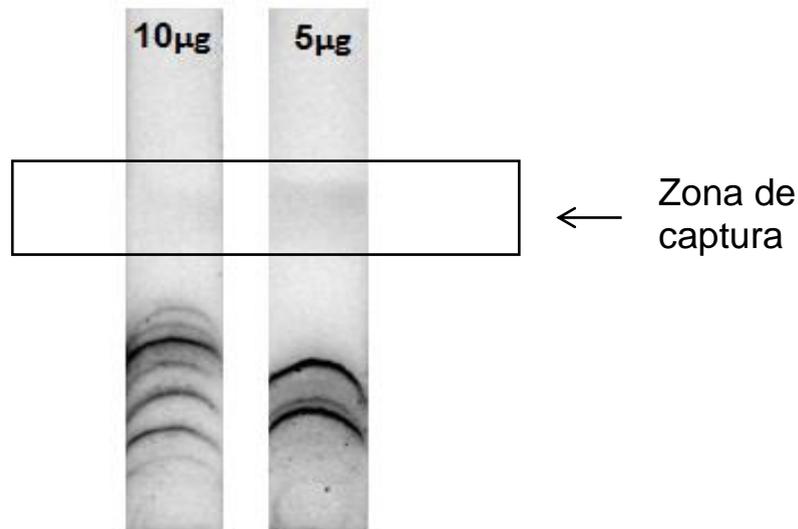


Figura 9: Ensaio competitivo em fluxo lateral – na 1ª fita (à esquerda) foram aplicados no sistema NTC acoplado ao anticorpo anti-HRP2 adicionados 10 µg do anticorpo imobilizado na fita. À direita, o teste com NTC acoplado adicionados 5 µg do anticorpo imobilizado na fita. Observa-se que a banda da 1ª fita (à esquerda) é mais fraca que a 2ª fita.

Alterações na concentração do PVP e na duração dos ciclos de sonicação dos NTCs preparados segundo a metodologia descrita por Abera e Choi (2010) permitiram melhorar a solubilidade dos NTCs, fazendo com que este pudesse fluir melhor no sistema, intensificando a formação da banda na zona de captura (Figura 10).

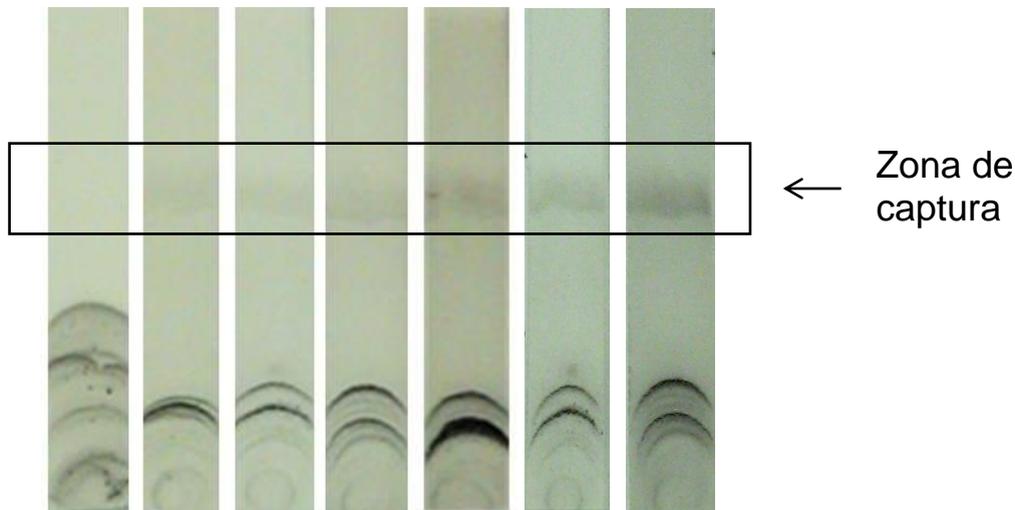


Figura 10: Testes de fluxo dos NTCs com alterações na metodologia descrita por Abera e Choi (2010) – ensaios imunocromatográficos comparando as alterações na concentração de PVP e tempo de sonicação dos NTCs.

Nestes experimentos detectou-se a presença de marcações na porção inferior de todas as fitas testadas com esta metodologia. Estas marcações são formadas por NTCs ainda em tamanho muito grande para serem utilizados no sistema. Apesar das inúmeras tentativas de eliminar este problema, não foi possível saná-lo ou diminuí-lo nos NTCs preparados segundo a metodologia de ABERA e CHOI (2010). Desta forma, o desenvolvimento de uma nova metodologia de solubilização dos NTCs foi a solução encontrada para superar este problema.

6.1.3 Testes de fluxo e solubilidade dos nanotubos de carbono preparados segundo a metodologia desenvolvida neste trabalho

Nas tentativas de aumentar a solubilidade e melhorar o fluxo dos NTCs no sistema em fluxo lateral nossa equipe desenvolveu uma nova metodologia de preparo que solubiliza os nanotubos de carbono através de ciclos de tratamento de sonicação e centrifugação com tampão contendo polivinil

pirrolidona (PVP). Esta nova metodologia permite que o NTC seja desidratado e ressuspensionado em água, mantendo fluidez em testes imunocromatográficos.

O primeiro ensaio realizado com o NTC produzido pela nossa equipe foi um teste de fluxo para analisar sua fluidez no sistema em fluxo lateral. Uma alíquota de 20 μL do NTC filtrado foi aplicada em uma membrana de nitrocelulose previamente tratada com Tris glicina. O fluxo foi mais rápido e não foi observada a presença de marcação na porção inferior da membrana (Figura 11).



Figura 11 : Fluxo do NTC filtrado – teste de fluxo do NTC depois da filtração, ausência de retenção na porção inferior da fita.

Após a verificação do fluxo deste NTC filtrado, sua solubilidade em água foi testada. Para isso, alíquotas de 100 μL do NTC filtrado foram centrifugadas a 14.000 rpm por 1 hora e secadas em SpeedVac. Adicionou-se água MilliQ e o NTC foi deixado em repouso por 24h para observar possível precipitação. Após esse período, as alíquotas foram observadas e o NTC continuou solúvel sem precipitação visível (Figura 12).

Nesta metodologia de preparo, o nanotubo de carbono foi capaz de ser desidratado e ressuspensionado em água. Esta característica é importante para o sistema em fluxo lateral, não somente pelo fato de sua fluidez na membrana de nitrocelulose, mas principalmente para as etapas de fixação dos nanotubos funcionalizados às membranas de vidro. Faz-se necessário

que o nanotubo de carbono tenha uma boa capacidade de se reidratar e fluir até a membrana absorvente na outra extremidade da fita.

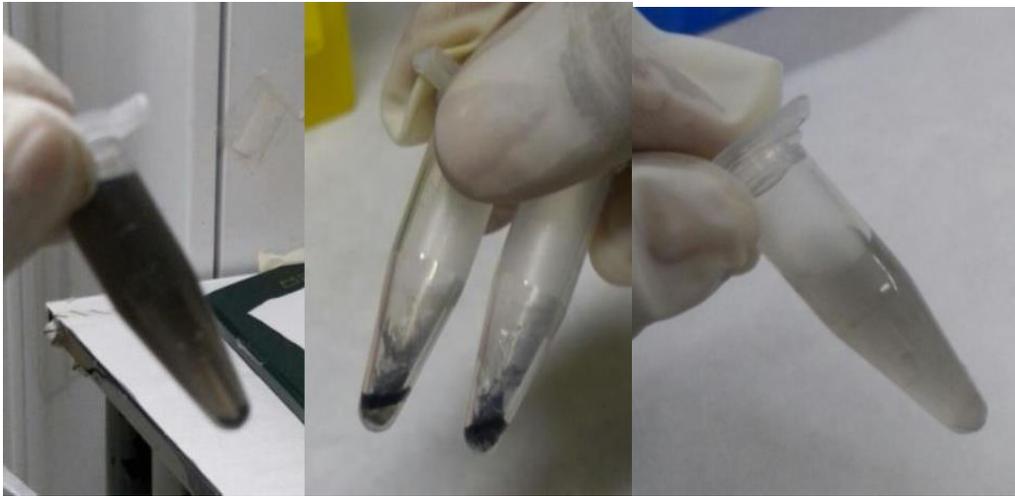


Figura 12: Etapas do teste de solubilização em água. Formação de precipitação após 1 hora de centrifugação a 14.000 rpm (imagem à esquerda) , NTC solúvel filtrado após secagem no Speed Vac (imagem ao centro). À direita, NTC solúvel filtrado ressuspensionado em 1 mL de água MilliQ.

Esta dispersão também é necessária para aplicação dos nanotubos de carbono em testes de detecção de antígenos em sistemas lateral flow para aumentar a exposição da superfície dos nanotubos de carbono em soluções aquosas. Esta exposição facilita a obtenção de ligações mais fortes entre o nanotubo de carbono e anticorpos através de ligação amida estável e irreversível (ABERA e CHOI, 2010).

A capacidade de solubilização apresentada pelo tratamento com surfactante PVP foi eficaz na dispersão dos nanotubos de carbono, mesmo após a sua secagem e ressuspensão em água, mantendo a dispersão homogênea em temperatura ambiente de 35°C por meses sem formação de precipitados. A capacidade de dispersão do PVP também foi demonstrada em outro estudo para funcionalização de nanotubos de carbono mas apresenta formação de agregados dias após o preparo, diminuindo a sua dispersão. Os surfactantes ainda auxiliam no bloqueio dessas estruturas evitando a interação não específica dos nanotubos de carbono e anticorpos, evitando a formação de falsas bandas positivas no teste (ABERA e CHOI, 2010).

6.2 APLICAÇÃO DOS NANOTUBOS DE CARBONO FUNCIONALIZADOS EM IMUNOENSAIOS

Obtidos os nanotubos de carbono solúveis em água e com a capacidade de ser desidratado e reidratado, prosseguimos os experimentos testando sua funcionalização em fitas imunocromatográficas. Deste modo, para evitar o reconhecimento inespecífico na zona de captura na membrana de nitrocelulose foram realizados testes para avaliação do bloqueio por BSA em diferentes concentrações. Para este experimento foram retiradas cinco alíquotas de 30 μL de NTCs ativados com EDAC e NHS. Após, foi adicionado BSA em quatro alíquotas, em diferentes concentrações (20%, 30%, 40% e 50%, respectivamente) e deixados em shaker por 30 minutos. Após, foi realizado o teste de corrida em fitas imunocromatográficas com anticorpo anti-Rabbit imobilizado na linha controle e anticorpo anti- HRP2 imobilizado na linha teste (ambos à $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$) (Figura 13).

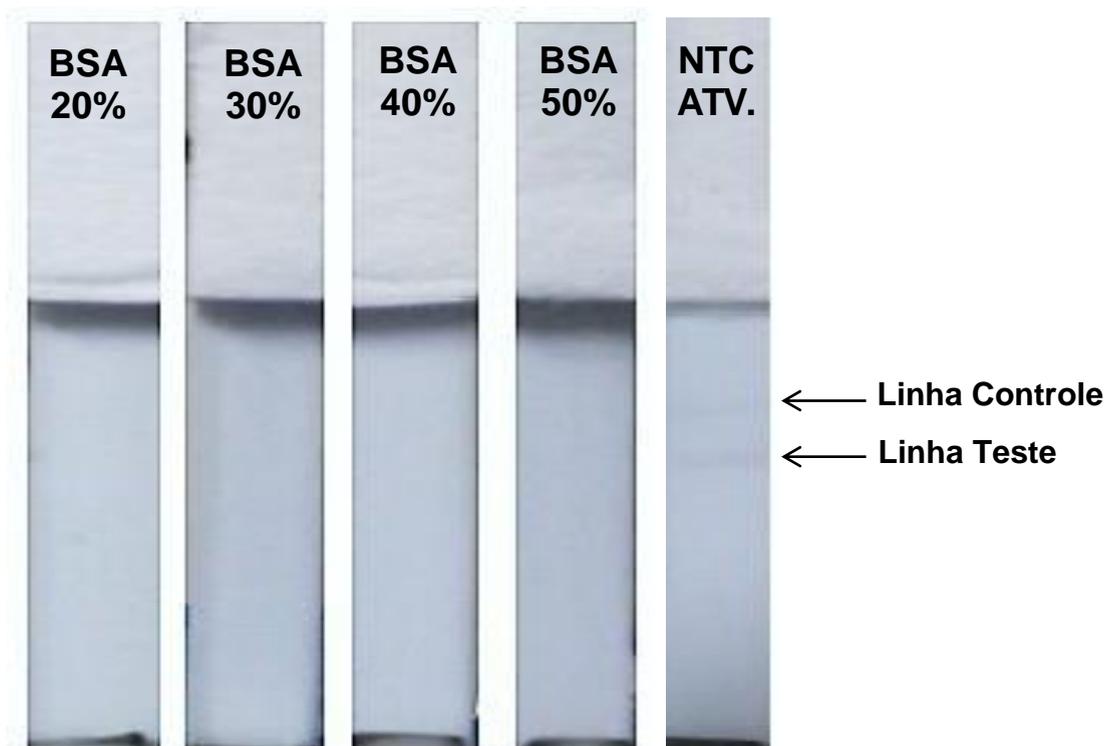


Figura 13: Fluxo do NTC filtrado bloqueado por BSA – Nas fitas com BSA não foram observadas reconhecimento inespecífico. Na fita com NTC filtrado ativado um fraco reconhecimento inespecífico é observado na linha teste e linha controle.

Nos sistemas em que foram utilizados NTCs ativados e bloqueados com BSA não foi observada a formação de banda na linha teste e na linha controle nas fitas testadas. Contudo, houve formação de banda na linha controle e linha teste quando utilizado somente o NTC ativado, indicando um reconhecimento inespecífico. Durante a corrida de teste, os NTCs bloqueados a 20% de BSA apresentaram melhor desprendimento da fibra de vidro, liberando maior quantidade de NTCs no sistema.

As fitas deste teste apresentavam a membrana de nitrocelulose um pouco escurecida pela presença de NTCs presos à membrana, mesmo após a etapa de lavagem da fita. Para sanar este problema foi adicionado Uréia a 200 mM ao tampão de corrida PBS 1X, que também auxilia no bloqueio evitando reconhecimento inespecífico. Ainda nestes testes, foi observada uma retenção considerável de nanotubos de carbono nas fibras de vidro utilizadas no sistema. A partir desta consideração, foram testadas técnicas de bloqueio das fibras de vidro, a fim de aumentar a quantidade de NTC liberados da fibra de vidro nos testes de corrida.

Para os testes de bloqueio da fibra de vidro foram realizados testes iniciais com variações na concentração de NTCs funcionalizados na fibra de vidro (15 μ L, 30 μ L e 60 μ L) para avaliar a capacidade de retenção de nanotubos nas fibras de vidro. As fitas com 15 μ L de NTCs na fibra de vidro liberaram mais NTCs e fluíram mais rápido que as fibras de vidro com 60 μ L. As fibras de vidro com 60 μ L apresentaram uma grande retenção na própria fibra, liberando menos NTC no fluxo (Figura 14).

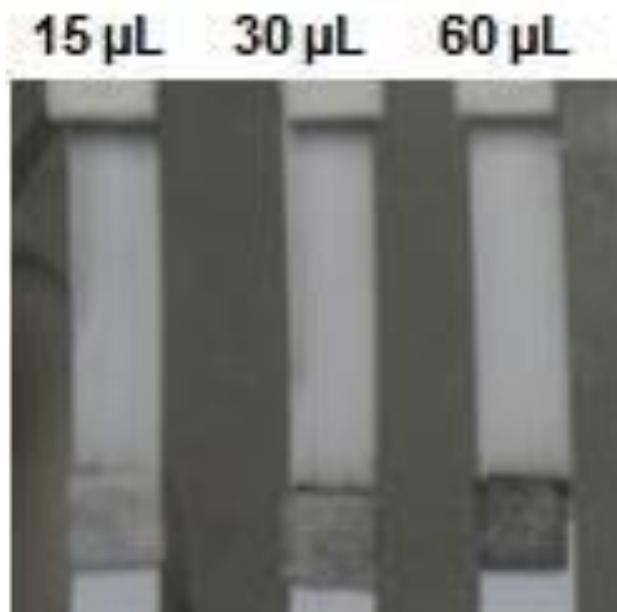


Figura 14: Testes de fluxo com a fibra de vidro – Na foto, nota-se que a fibra de vidro com 15µL está mais clara e a de 60µL mais escura que as demais, esta última apresentando maior retenção de NTCs na fibra.

Para melhorar o fluxo e diminuir a retenção de NTCs na base da membrana de nitrocelulose foram realizados ensaios com diferentes métodos de bloqueio da membrana. Foram feitas variações na concentração de BSA (2%, 1%, 0,5% 0,25% e 0,1%), com e sem etanol e Tween 20. Destes, a condição que apresentou o melhor resultado de fluxo foi a 0,25% de BSA a 0,05% de Tween 20, com o fluxo mais rápido e menor retenção na membrana de nitrocelulose, agindo no fluxo como bloqueadores e dispersadores.

Ainda nos testes para diminuir a retenção de NTCs na fibra, foram realizados testes de fluxo com variações na concentração de sacarose e BSA (3%, 1%, 0,25% e 0%). A sacarose apresentou bons resultados em testes de fluxo utilizando somente o NTC funcionalizado. Quando o problema de retenção de NTCs foi superado, utilizando apenas NTC funcionalizado como amostra, foram realizados testes posteriores utilizando soro como amostra. Então, as fibras de vidro utilizando sacarose tornaram-se inviáveis apresentando fluxo muito lento. Comparando o tempo de corrida dos testes com BSA e os testes com sacarose, o BSA obteve melhores resultados, com fluxo mais rápido do que o da sacarose, quando testado somente com

nanotubos na fase móvel e quando testados com soro. A melhor condição encontrada nos testes competitivos com NTC funcionalizados e no teste com soro foi a de 0,25% de BSA (Figura 15).

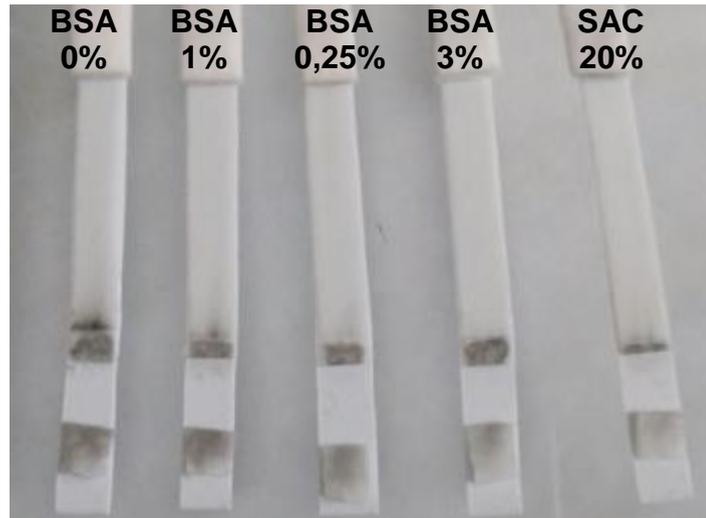


Figura 15: Bloqueio das fibras de vidro com BSA e sacarose (SAC) – Nesta figura podemos observar a quantidade de NTC que desprenderam e fluíram no sistema e os que ficaram retidos na membrana. A fita com sacarose foi a que mais desprendeu e menos ficou retida na membrana.

Nos testes realizados com sangue e soro, as membranas de aplicação da amostra foram tratadas com PBS 0,1X, 1% BSA e 0,05% de Tween 20 secando a 37°C. Para este teste, foram imobilizados na membrana de nitrocelulose os anticorpos anti-LDH (3µg/µL) na altura de 3,1 cm, anti-HRP2 (3µg/µL) na altura de 3,4 cm e um controle positivo com anticorpo anti-Rabbit (3µg/µL) na altura de 3,7 cm. Na fibra de vidro foram aplicados 10 µL de nanotubos funcionalizados com anti-LDH e mais 10 µL de nanotubos funcionalizados com anti-HRP2 e posteriormente secados a 37°C. Foram aplicados 5 µL da amostra (soro ou sangue) na membrana de aplicação, em seguida foi aplicado o tampão de lise. Foram testados três diferentes tipos de tampões de lise para os testes com sangue: com saponina, Tween e Triton. Destes, o que apresentou melhor resultado foi o Triton. Entretanto, os testes realizados com sangue não apresentaram resultados satisfatórios,

apresentando problemas no fluxo. Mais testes seriam necessários para tentar sanar este problema.

Foi realizado também, testes em formato competitivo utilizando estes nanotubos de carbono desenvolvidos de acordo com a metodologia proposta neste trabalho, onde foram realizados testes de imunoenensaio em fluxo lateral. Neste ensaio foram realizadas variações na concentração de anticorpo anti-Rabbit (4, 2, 1, 0,5, 0,25, 0,12 e 0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) adicionados durante a reação de acoplamento em amostras de 100 μL dos nanotubos de carbono filtrado e ativados com EDC e Sulfo-NHS. Neste teste a aplicação da fase móvel foi feita diretamente na membrana de nitrocelulose, sem a fibra de vidro. Não houve formação de banda na linha teste nas condições de 0,12 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e 0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (controle negativo). Nas demais fitas foram observadas a formação de banda na linha teste e variação da intensidade da banda diretamente proporcional à concentração do anticorpo na fase móvel, sendo o sinal mais forte o de 4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e o mais fraco o de 0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (Figura 16).

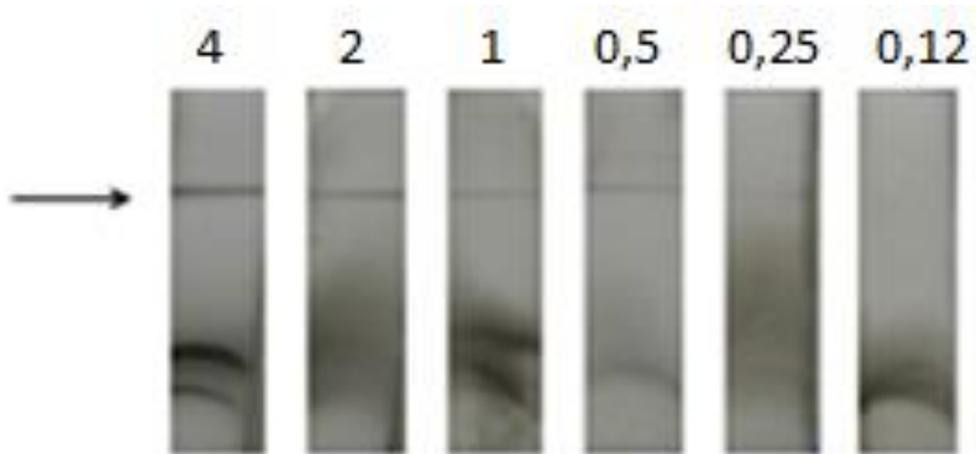


Figura 16: Fitas após ensaio. Na fita 1 ac. à 4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; na fita 2 anticorpo a 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; na fita 6 não é possível visualizar banda na zona de captura indicada por seta.

Nestes testes, quando utilizado soro humano como amostra foram obtidos os melhores resultados quando comparado aos testes utilizando sangue como amostra. Os testes com soro não apresentaram os problemas de fluxo encontrados nos testes com sangue além de apresentarem

formação de bandas bem visíveis no sistema. Este teste também apresentou uma falha já corrigida em ensaio posterior. Foi observado um fraco reconhecimento inespecífico e para tentar sanar este problema, foi adicionado uma etapa de bloqueio com BSA após a reação de acoplamento dos nanotubos na fase móvel (figura 17).

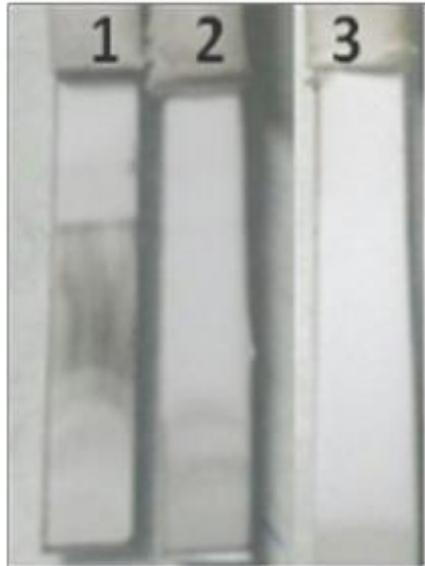


Figura 17: Teste em NTCs bloqueados após acoplamento – Nas fitas 1 e 2, NTC filtrado ativado e NTC não ativado (ambos sem BSA), podemos perceber a presença de marcação, um reconhecimento inespecífico. Na Fita 3, NTC filtrado ativado com 20% de BSA, sem formação de banda na zona de captura.

Para melhor avaliar o funcionamento dos nanotubos de carbono, preparados segundo a metodologia proposta neste trabalho, em um sistema imunocromatográfico já padronizado, seu funcionamento em fitas produzidas em Biomanguinhos, na FIOCRUZ do Rio de Janeiro. Essas fitas de Biomanguinhos tem Proteína A como controle positivo e na linha teste anti-HRP2. Para este ensaio em formato sanduíche, foi utilizada como amostra a proteína HRP2 obtida em estudos anteriores (Figura 18).

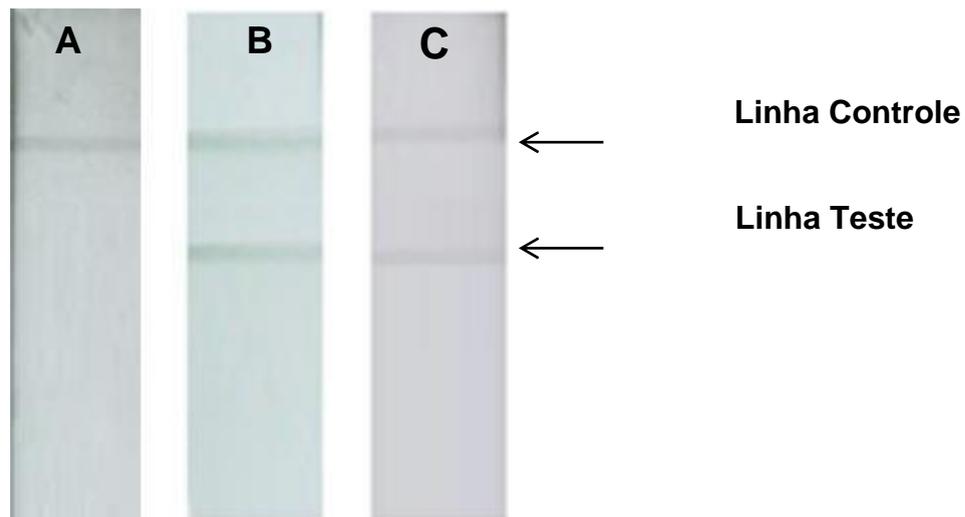


Figura 18: Membranas de nitrocelulose das fitas produzidas em Biomanguinhos após teste de corrida. A) Controle negativo, aparecendo somente a banda controle. B e C fitas testas com uso de proteína recombinante, surgimento de banda nas linhas teste e controle.

Neste teste foram aplicados 5 μ L de HRP2 na membrana de amostra das fitas testes (B e C da figura) e na fita controle foi adicionado apenas o tampão de corrida (PBS 1X + Ureia 200 mM) no lugar da amostra. Os nanotubos acoplados na membrana de amostra, também do sistema fornecido pela Fiocruz do Rio de Janeiro (Biomanguinhos), se desprenderam com facilidade e fluíram pelo sistema. Houve formação de banda na linha controle e na linha teste nas fitas produzidas em Biomanguinhos, FIOCRUZ. No controle negativo houve formação de banda na linha controle, mas não houve formação de banda na linha teste, não apresentando reconhecimento inespecífico.

A metodologia de solubilização de nanotubos de carbono desenvolvida neste trabalho permite a sua detecção de analitos em diferentes concentrações. Os resultados obtidos neste estudo demonstram sua aplicabilidade em sistemas em fluxo lateral para detecção de patógenos, o que o torna interessante não só para a detecção de antígenos maláricos testados neste estudo, mas também abre possibilidades de sua aplicação em outros métodos de detecção, como o desenvolvimento de teste rápido para diagnóstico de outras patologias. Esta metodologia de solubilização de nanotubos de carbono também faz com que estes nanotubos sejam aplicáveis em testes moleculares, imunoenaios e cromatografias.

6.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICA DOS NANOTUBOS DE CARBONO

6.3.1 Espectroscopia Raman

A caracterização dos nanotubos de carbono apresentada neste trabalho tem por objetivo observar as mudanças ocorridas na estrutura dos nanotubos de carbono a cada etapa de sua preparação, desde a solubilização à funcionalização para aplicabilidade em sistemas imunocromatográficos. Foram então realizadas espectroscopias Raman nas diferentes etapas de preparo dos nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT).

As análises foram iniciadas com amostras de NTC originais. Na figura 19.a está o espectro Raman dos MWCNTs originais dispersos com suas principais bandas. Neste espectro foram identificadas três bandas distintas. A primeira é a banda D, conhecida como banda da desordem, e está associada à presença de carbono amorfo e estruturas de grafeno nas bordas dos nanotubos de carbono, encontra-se em números de onda próximos a 1340 cm^{-1} . A segunda banda, chamada banda G de alta frequência, corresponde às vibrações tangenciais dos átomos de carbono e é a principal característica dos nanotubos. Estes se encontram em números de onda entre 1500 e 1600 cm^{-1} . A terceira banda é chamada de G, ou banda 2D, e é geralmente usada para indicar a qualidade das estruturas de grafeno (BELIN e EPRON, 2005).

Também foi observado o espectro Raman do polímero surfactante polivinil pirrolidona (PVP) utilizado no processo de solubilização dos nanotubos de carbono e nele são identificadas diferentes bandas que correspondem aos modos vibracionais do polímero (Figura 19.b).

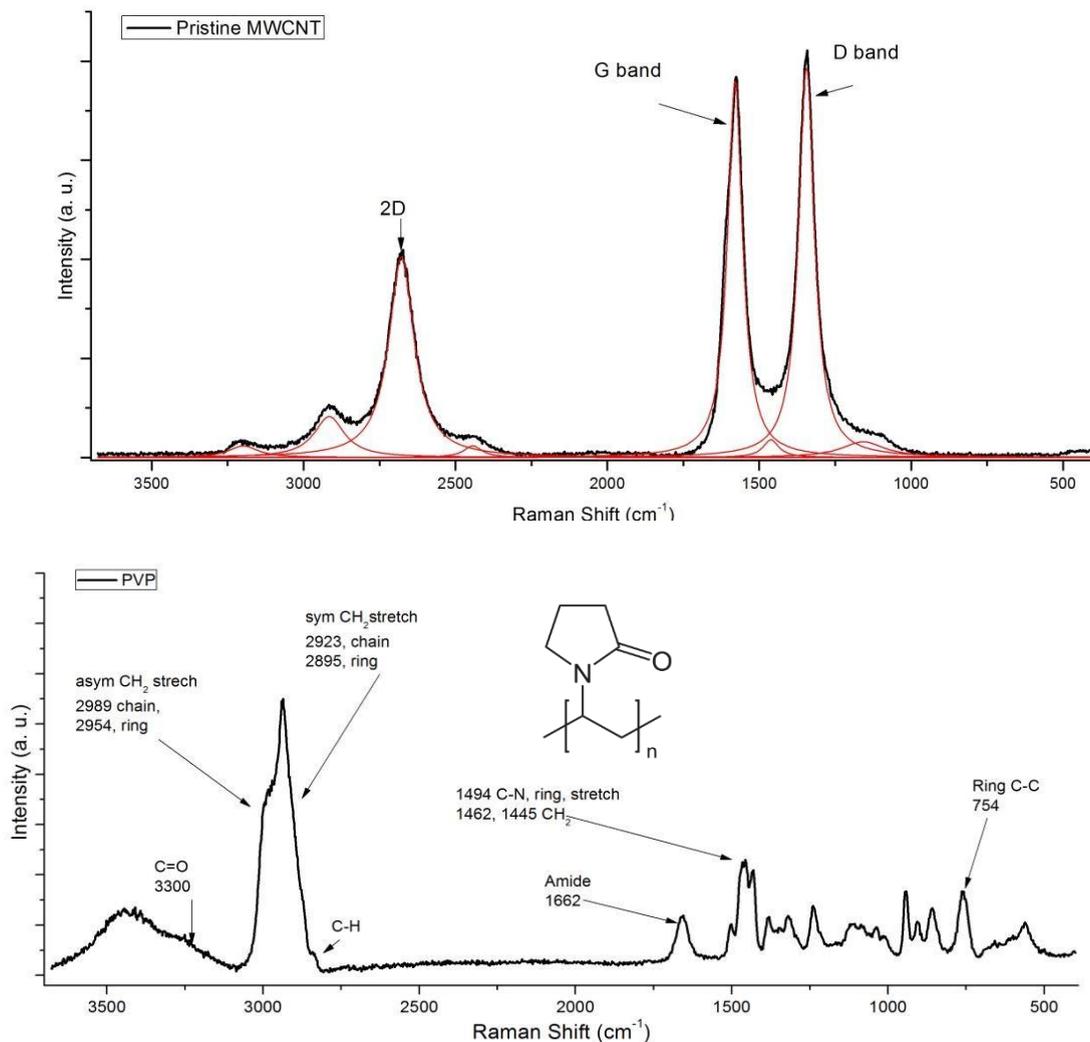


Figura 19: Espectro Raman dos (a) nanotubos de carbono de paredes múltiplas (Pristine MWCNTs) antes do processo de dispersão e (b) espectro do PVP.

A segunda etapa da análise foi realizada utilizando como amostra os nanotubos de carbono após sua solubilização. Na figura 20, a intensidade das bandas D e 2D aumenta e diminui, respectivamente. Indicando que os NTCs solúveis apresentam mais defeitos do que os originais, ou seja, gerou-se uma desordem maior nos átomos de carbono dos nanotubos de carbono.

Também apresentou um aumento na relação das intensidades das bandas D e G (I_D/I_G) nos MWCNT originais, partindo de um valor de 1,10 alcançando até 1,26 nos nanotubos dispersos (wd-MWCNT). Tem sido demonstrado que a intensidade da banda D relacionada com a intensidade da banda G aumenta com a quantidade de desordem, por isso que a relação

de intensidades I_D/I_G é geralmente usada para estimar mudanças nas estruturas carbonosas e o tamanho médio das estruturas cristalinas-planares (TUINSTRA e KOENIG, 1970).

Esta redução na intensidade da banda 2D nos wd-MWCNT indica uma possível redução do teor de estruturas de grafeno nas dispersões e a produção de carbono amorfo devido a quebra e exfoliação dos NTC em tamanhos menores.

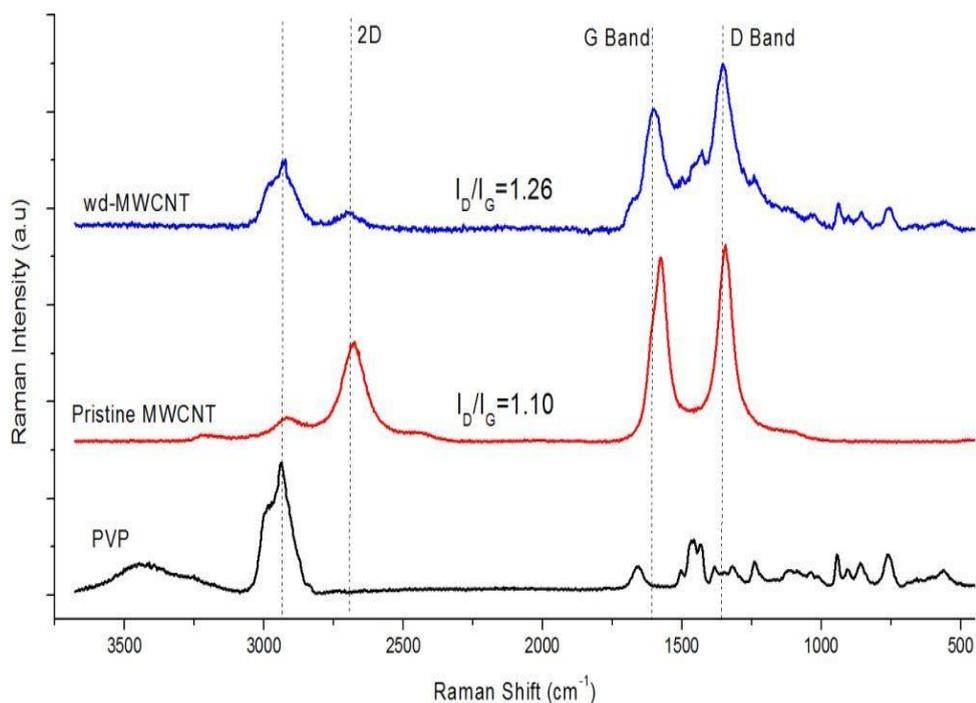


Figura 20. Comparação dos espectros Raman de cada uma das etapas de dispersão de MWCNTs em PVP

6.3.2 Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-Vis)

A espectroscopia de absorção no UV-Vis representa uma poderosa ferramenta na avaliação da capacidade de dispersão do surfactante utilizado na solubilização dos nanotubos de carbono. Os MWCNT possuem bandas

características de absorção, ativos na região entre 240~265 nm. A análise em comprimento de onda específico pode estar diretamente relacionadas ao grau de exfoliação e complexidade das estruturas (RAUSH et al., 2010; CHENG et al., 2011). Durante o processo de solubilização dos NTCs são empregados ciclos de sonicação.

A utilização desta ferramenta na solubilização dos NTCs faz com que haja uma tendência de absorbância no UV-Vis proporcional a complexidade das estruturas. Quanto maior a complexidade da estrutura, maior a absorbância dela. Assim, a estrutura de maior absorbância foi o NTC acoplado ao anticorpo anti-LDH e bloqueado com BSA (wd-MWCNT acoplados com A- LDH/BSA). Durante o tratamento com ultrassom são eliminados os aglomerados de MWCNT, o que por sua vez melhora a dispersão destes.

A figura 21 apresenta os espectros de absorbância na região UV-Vis de soluções aquosas de MWCNT, incluindo as etapas de ativação e acoplamento das estruturas às biomoléculas. Observa-se um aumento nos valores da absorbância devido à adição e acoplamento de estruturas biológicas com os wd-MWCNT no processo de imobilização. É importante ressaltar que o surfactante PVP absorve na mesma região (190-230nm) que as estruturas de carbono estudadas (TURKER et al., 1990).

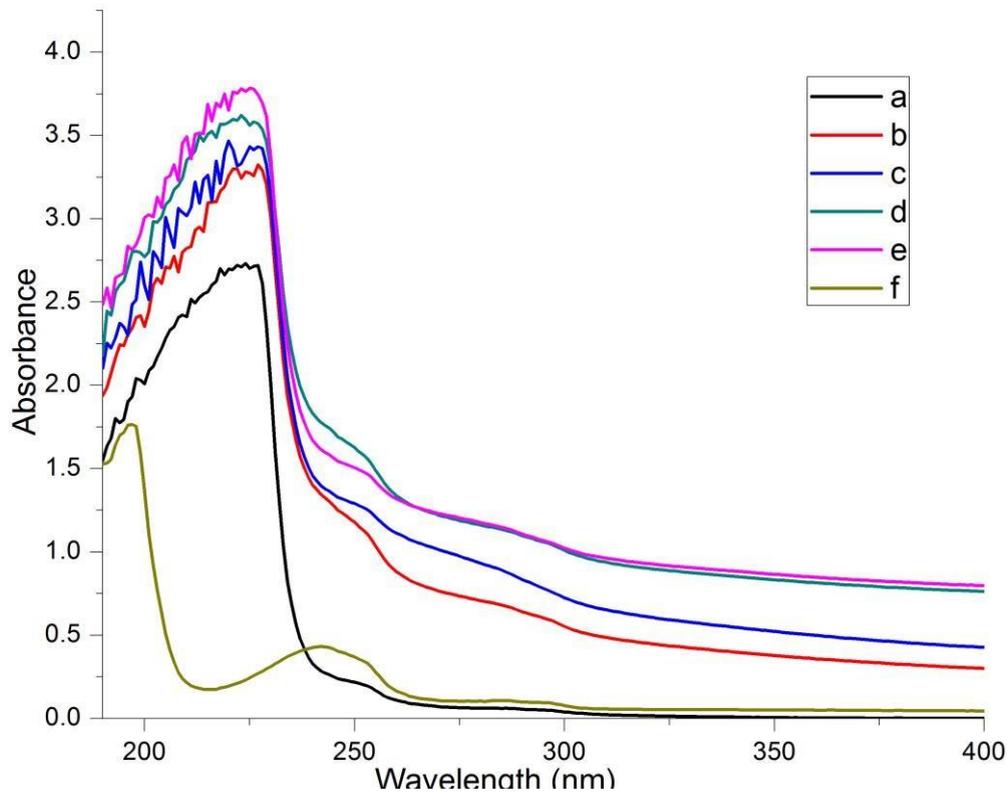


Figura 21. Espectro de absorvância na região UV-Vis de soluções aquosas de MWCNT nas diferentes etapas de imobilização e acoplamento de anticorpos (A-LDH). a. solução de PBS/PVP, b. wd-MWCNTs, c. wd- MWCNT ativado com EDC/NHS, d. wd-MWCNT acoplados com A-LDH, e. wd-MWCNT acoplados com A- LDH/BSA, f. Solução de anticorpos PBS/A-LDH.

6.3.3 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIV)

A espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR, do inglês, *Fourier-Transform Infrared Spectrometry*) é uma das espectroscopias vibracionais com aplicações que vão desde análises de pequenas moléculas até análises de sistemas mais complexos, como células e tecidos (BERTHOMIEU e HIENERWADEL, 2009). Esta técnica de análise utiliza um interferômetro para guiar a luz IV. Assim, através desta mudança do caminho óptico entre dois feixes um sinal é gerado, o interferograma. Por meio de cálculos matemáticos, da transformada de Fourier, a distância do

comprimento óptico pode ser convertida para o valor da frequência de radiação e vice-versa.

A figura 22 mostra espectros do FTIR dos nanotubos de carbono nas diferentes etapas de solubilização, com objetivo de fazer uma comparação das mudanças que ocorrem nos nanotubos de carbono no processo de funcionalização. Os picos demonstrados na figura 22.a são próximos a 1602 e 1568 cm^{-1} , característicos das vibrações das ligações C-C (WORKMAN, 2000; SHANMUGHARAJ et al., 2007)

Para os espectros correspondentes as etapas de wd-MWCNT ativado com EDC/NHS, wd-MWCNT acoplados com A-LDH e wd-MWCNT acoplados com A-LDH/BSA (Figura 22: d,e,f), respectivamente, observa-se um aumento da intensidade das bandas atribuídas ao modo de alongamento dos grupos aminos – NH ($3440\text{-}3124 \text{ cm}^{-1}$) fornecidos pelos agentes de acoplamento utilizados e adição de biomoléculas com conteúdo de grupos amino na sua estrutura.

Na Figura 22.d e 22.e ocorre uma mudança na forma do pico de absorção próximo a 1550-1650, devido a contribuição do pico atribuído a presença da ligação amida, a qual provem da formação de uma ligação covalente (-CONH-) entre o CNT e IgG através dos grupos funcionais (JAIN et al., 2012; YI et al., 2010).

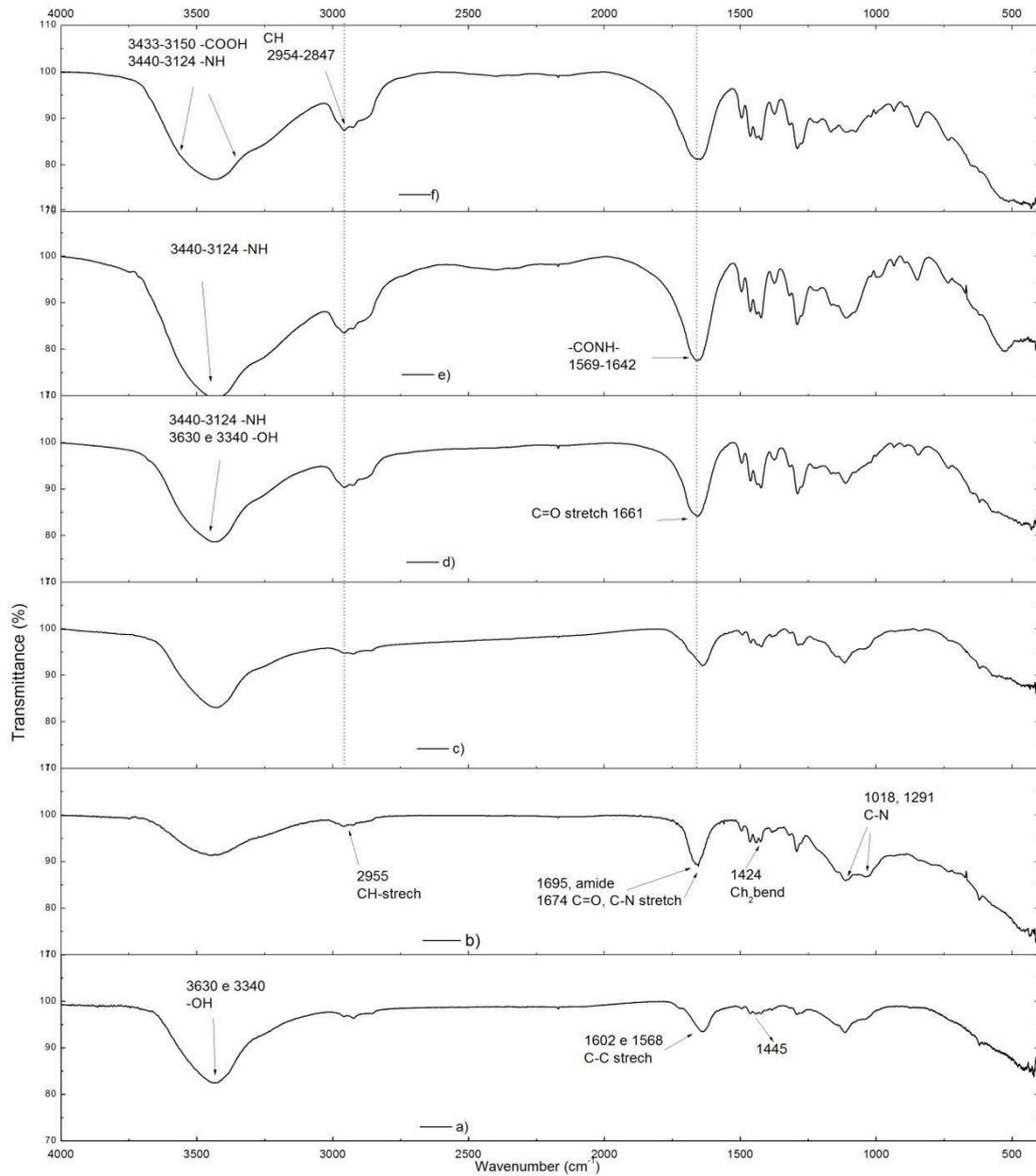
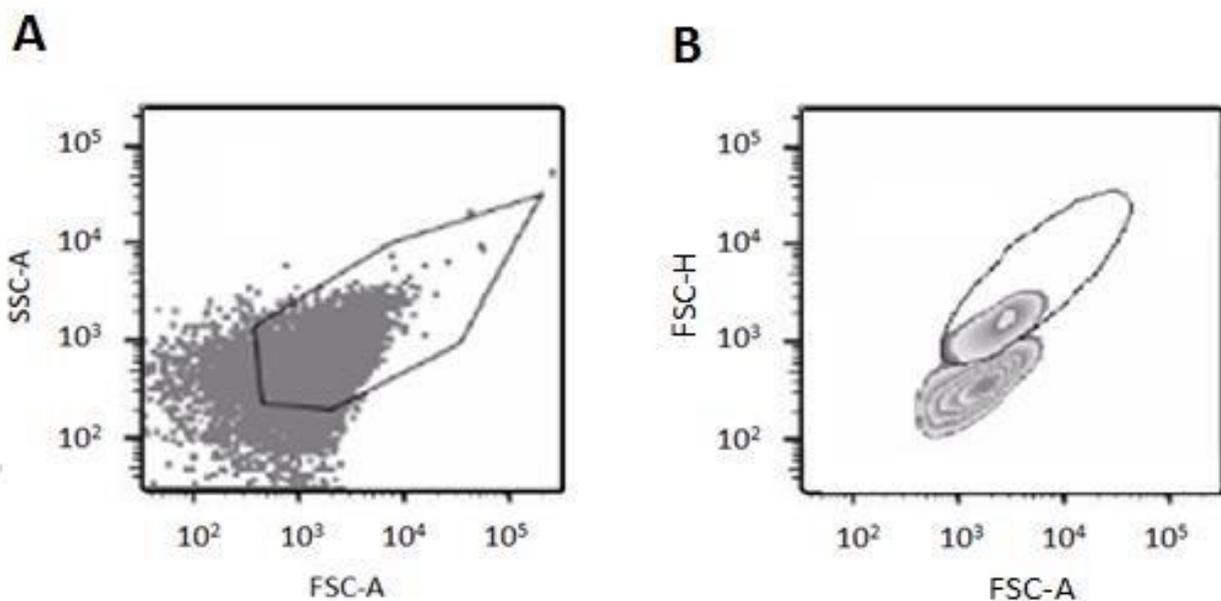


Figura 22. Espectros de absorção no FTIR de MWCNTs nas diferentes etapas de solubilização e imobilização. Onde a. MWCNTs originais, b. solução de PBS/PVP, c. wd-MWCNTs, d. wd-MWCNT ativado com EDC/NHS, e. wd-MWCNT acoplados com A-LDH, f. wd-MWCNT acoplados com A-LDH/BSA;

6.3.4 Citometria de fluxo

Esta técnica permite analisar diferentes parâmetros de partículas ou células em suspensão. Neste trabalho a técnica possibilitou determinar os padrões característicos dos constituintes de MWCNT e avaliar o comportamento dos nanotubos de carbono e seus componentes durante o processo de solubilização dos nanotubos de carbono.

De acordo com a classificação de TIWARI *et al.*,(2012), na figura 23 após o processo de solubilização apareceram populações distintas: nanotubos longos, nanotubos curtos, nanopartículas, detritos e fragmentos. Na solução analisada, estão em maior concentração nanotubos de carbono curtos e nanopartículas. Há também uma boa quantidade de pequenos fragmentos. À medida que o comprimento do nanotubos diminui, a população correspondente se desloca para um valor de dispersão menor, mas ainda presente ao longo da diagonal.



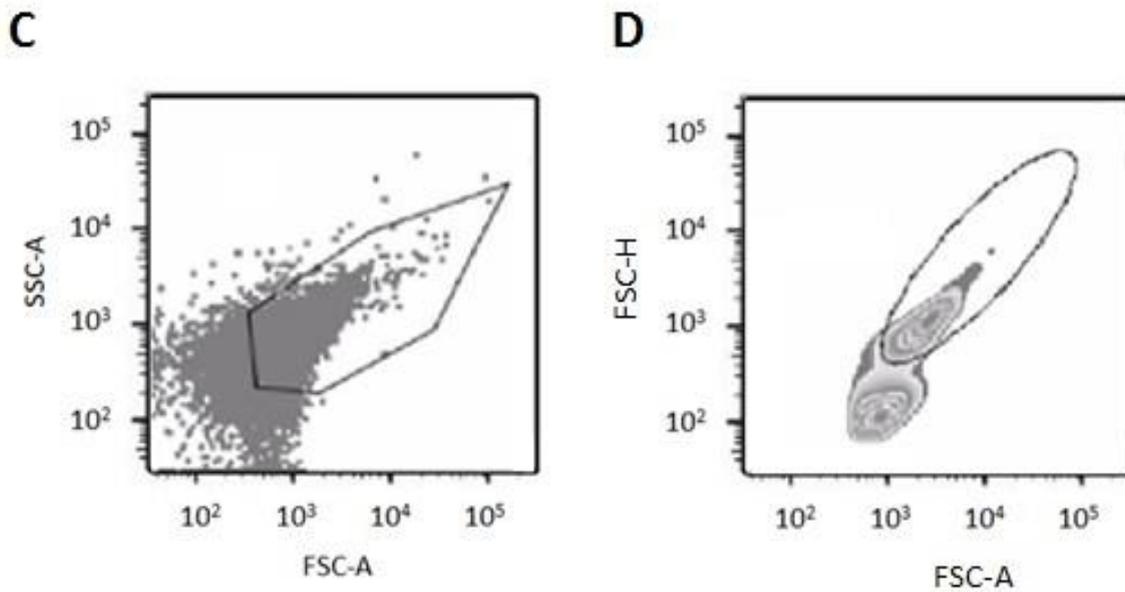


Figura 23: Análise de nanotubos de carbono (NTC) por citometria de fluxo – Avaliação dos parâmetros de tamanho (FSC) e complexidade (SSC) dos NTCs de carbono não acoplados (A e B) e acoplados (C e D).

Também foi analisada a quantidade de nanotubos de carbono que apresentavam de fato estar acoplados ao anticorpo. Tanto os nanotubos de carbono longo, nanotubos de carbono curto e ainda as nanopartículas apresentavam em sua superfície o anticorpo acoplado (Figura 24). Foram analisadas duas amostras de nanotubos acoplados com marcador que permite a leitura no FACS de nanotubos de carbono e nanopartículas acopladas ao anticorpo.

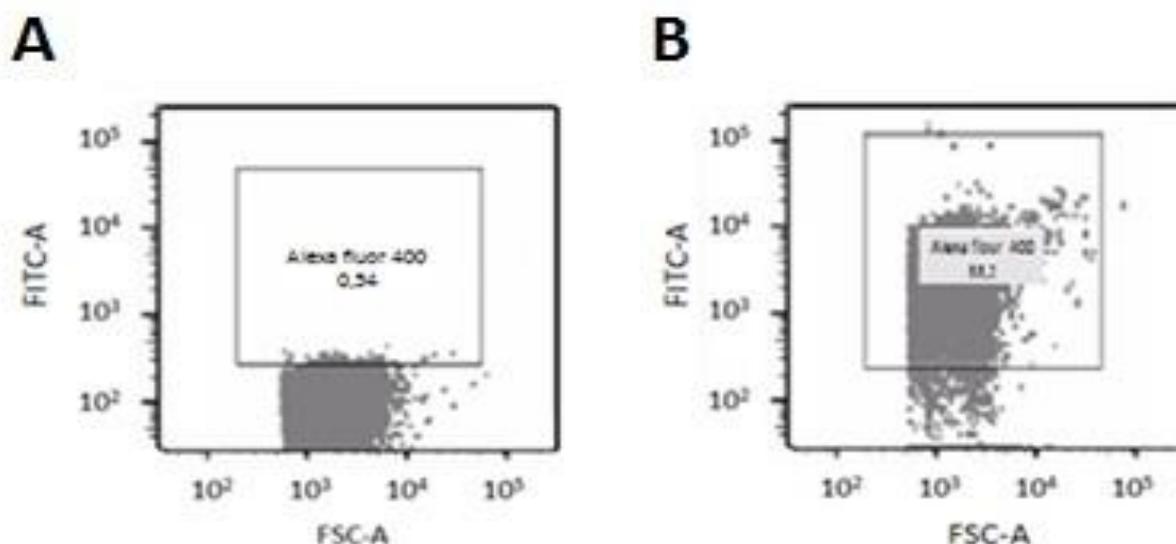


Figura 24: Análise por citometria de fluxo para determinação de porcentagens de fluorescência de anticorpos conjugados com isotiocianato de fluoresceína (FITC) acoplados em NTCs em amostras não acopladas (A) e acopladas (B).

Para eliminação de detritos foram realizadas 5 repetições de lavagens por centrifugação. Na primeira amostra foi utilizado PBS 1X na lavagem e na segunda amostra foi utilizado PVP (120 mg/mL).

Na leitura do FACS, observa-se que a maior concentração de anticorpo acoplado está ligada aos nanotubos de carbono curto, seguido das nanopartículas de carbono e nanotubos de carbono longo, respectivamente. Ainda assim, o acoplamento foi realizado satisfatoriamente mesmo em pequenos fragmentos.

Na amostra em que a lavagem foi feita com PBS 1X, a concentração de nanotubos de carbono curtos e nanopartículas são menores que na amostra de lavagem com PVP. Além disso, também apresenta maior quantidade de fragmentos e sujeira se comparado ao tratado com PVP. Essa variação está diretamente relacionada à capacidade de solubilização e manutenção da dispersão do PVP (Figura 25).

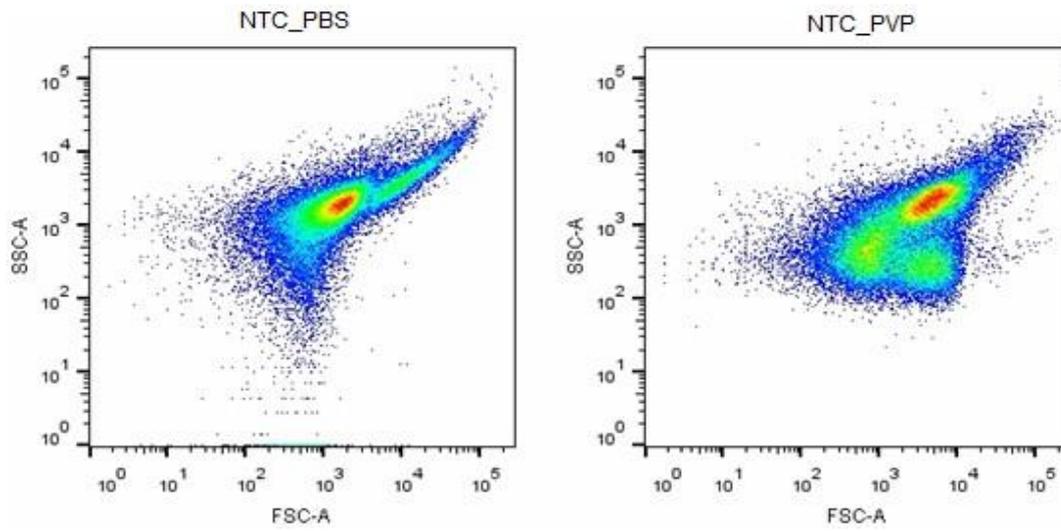


Figura 25: Citometria de fluxo, NTC tratado com PBS e NTC tratado com PVP.

CONCLUSÃO

A utilização de nanotubos de carbono tratados com PVP, sonicação e filtração, obtidos através da metodologia desenvolvida neste trabalho se mostrou bem promissora em sistemas de fluxo lateral. Estes nanotubos são passíveis de desidratação e posterior reidratação mantendo a boa solubilidade, sem formação de aglomerados visíveis de nanotubos de carbono, superando dificuldades descritas quanto a manutenção da solubilidade desses nanomateriais.

A caracterização destes nanotubos por espectroscopia de UV-Vis, Raman e FTIR, além das análises de citometria de fluxo permitiu identificar diferentes grupos de nanotubos de carbono após a solubilização. A maioria se refere à nanotubos de carbono curtos e nanopartículas, mas ainda há nanotubos de carbono longo em menor quantidade. Ainda assim o acoplamento aconteceu em todas estas populações de nanotubos de forma eficiente, possibilitando que estes nanotubos de carbono possam ser funcionalizados para aplicações de detecção em imunoenaios, por exemplo.

Por fim, fica comprovada que a aplicação de nanotubos de carbono obtidos pela metodologia obtida neste trabalho é eficiente para aplicação em imunoenaios, abrindo novas perspectivas para sua aplicação em diferentes análises, desde testes de detecção de antígenos à análise de compostos orgânicos diversos

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBA, K. et al. Rapid diagnostic tests for diagnosing uncomplicated *P. falciparum* malaria in endemic countries. *Cochrane Database Syst Rev.* 2011 Jul 6;(7):CD008122. Review. PubMed PMID: 21735422

ABERA, A; CHOI, J. Quantitative lateral flow immunosensor using carbon nanotubes as label. *Anal. Methods*, 2010,2, 1819-1822.

ALECRIM M. et al. Description of a possible clonal expansion of *Plasmodium vivax* in Manaus-Amazonas-Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 1999a, 32:303-305.

ALECRIM M, ALECRIM W, MACEDO V. *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine (R2) and mefloquine (R3) in Brazilian Amazon region. *Ver Soc Bras Med Trop* 1999b, 32:67-68.

BARBER, B. Limitations of microscopy to differentiate *Plasmodium* species in a region co-endemic for *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax* and *Plasmodium knowlesi*. *Malaria Journal*, 12, 8. doi:10.1186/1475-2875-12-8. 2013.

BELL, D; PEELING, R. W. WHO-Regional Office for the Western Pacific/TDR. Evaluation of rapid diagnostic tests: malaria. *Nat Rev Microbiol.* Sep;4(9 Suppl):S34-8. 2006.

BELIN T., EPRON, F. «Characterization methods of carbon nanotubes: review,» *Materials Science and engineering B*, pp. 105-118, 2005.

BERTHO, A.L., [entre 2001 e 2004], Apostila de Citometria de Fluxo. Disponível em: <<http://picf.ioc.fiocruz.br/apostila.doc>>. Acesso em: 8 set. 2016.

BERTHOMIEU, C.; HIENERWADEL, R. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. *Photosynth. Res.*, [S. l.], v. 101, n. 2-3, p. 157-170, 2009.

BRAGA, K. M. S., *et al.*, Citometria de fluxo: histórico, princípios básicos e aplicações em pesquisa. *Enciclopédia Biosfera* vol. 13, 304-319, 2016.

BRASIL – Ministério da Saúde. Guia para Gestão Local do Controle da Malária, Diagnóstico e tratamento. Série B. Textos Básicos de Saúde. Brasília – DF, 2008.

CABRAL, P. H. O. A. S. Malaria and sickle cell anemia: report of complications and clinical management of three patients in a highly endemic area for *Plasmodium vivax* malaria in the Brazilian Amazon. *Case Rep Clin Pract Rev* 2006, 7:220-223.

CHAKER, T.; *et al.*, Single-walled carbon nanotube chemoresistive label-free immunosensor for salivary stress biomarkers. *Analyst*, v. 135, p. 2637-2642, 2010.

CHENG, X. *et al.*, «Characterization of multiwalled carbon nanotubes dispersing in water and association with biological effects,» *Journal of Nanomaterials*, vol. 2011, pp. 1-12, 2011.

DE SANTANA FILHO, F. S. et al. Chloroquine-resistant *Plasmodium vivax*, Brazilian Amazon. *Emerg Infect Dis* 2007, 13:1125-1126.

DIALLO, A, et al. Asymptomatic carriage of plasmodium in urban Dakar: the risk of malaria should not be underestimated. *PLoS One*. 2012;7(2):e31100. Epub 2012 Feb 21. PubMed PMID: 22363558; PubMed Central PMCID: PMC3283586.

DRUILHE, P, et al. A colorimetric in vitro drug sensitivity assay for *Plasmodium falciparum* based on a highly sensitive double-site lactate dehydrogenase antigen- capture enzyme-linked immunosorbent assay. *Am J Trop Med Hyg*. 2001 May- Jun;64(5-6):233-41. PubMed PMID: 11463109.

ENDESHAW T, et al. Performance of local light microscopy and the ParaScreen Pan/Pf rapid diagnostic test to detect malaria in health centers in Northwest Ethiopia. *PLoS One*. 2012;7(4):e33014. Epub 2012 Apr 20. PubMed PMID: 22536317; PubMed Central PMCID: PMC3335029.

FARIA, D.L.A *et al.*, Sala, Fundamentos da Espectroscopia Raman e no Infravermelho. Editora da Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 1995.

FARIA, D.L.A *et al.*, Uma Demonstração Sobre o Espalhamento Inelástico de Luz: Repetindo o Experimento de Raman, *Química Nova* 20, 319, 1997

FORATO, L. A. A *et al.*, Espectroscopia na região do Infravermelho e algumas aplicações. São Carlos: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 2010.

GAMA B. E. et al. Real-time PCR versus conventional PCR for malaria parasite detection in low-grade parasitemia. *Exp Parasitol.* 2007 Aug;116(4):427-32. Epub 2007 Mar 2. PubMed PMID: 17433301.

GONÇALVES, J. C. Estudo da influência de nanotubos de carbono nas propriedades de revestimentos de poliuretano, Tese de Mestrado, Universidade do Minho, 2013.

HAICK, H. Nanotechnology and Nanosensors: Introduction to Nanotechnology. Haifa, Israel. 127c., 2013.

HARLOW, E; LANE, D. Antibodies, A Laboratory Manual. Cold Spring Laboratory, p.615-619, 1988.

HARPER, S, SPEICHER, D. W. Purification of proteins fused to glutathione S- transferase. *Methods Mol Biol.* 2011;681:259-80. PubMed PMID: 20978970.

HERBST, Marcelo Hawrylak; MACEDO, Maria Iaponeide Fernandes; ROCCO, Ana Maria; Tecnologia dos nanotubos de carbono: tendências e perspectivas de uma área multidisciplinar; *Química Nova*; v. 27, n. 6; p. 986-992; 2004

HONG, C.; YOU, Y.; PAN, C. Synthesis of Water-Soluble Multiwalled Carbon Nanotubes with Grafted Temperature-Responsive Shells by Surface RAFT Polymerization. *Chemistry of materials*, 2005.

HOUZÉ, S. et al. PfHRP2 and PfLDH antigen detection for monitoring the efficacy of artemisinin-based combination therapy (ACT) in the treatment of uncomplicated falciparum malaria. *Malar J.* 2009 Sep 7;8:211. PubMed PMID: 19735557; PubMed Central PMCID: PMC2754493.

IIJIMA, S. Helical microtubes of graphitic carbon. *Nature.* 1991 Nov. 354, 56 – 58.

INOUE, H; NOJIMA, H; OKAYAMA, H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene.* 1990, Nov 30;96(1):23-8.

IQBAL, J. et al. Persistent histidine-rich protein 2, parasite lactate dehydrogenase, and panmalarial antigen reactivity after clearance of *Plasmodium falciparum* mono-infection. *J Clin Microbiol.* 2004 Sep;42(9):4237-41. PubMed PMID: 15365017; PubMed Central PMCID: PMC516301.

JAIN, K. K. Handbook of Nanomedicine. In :Nanomolar Diagnostic and Nano-Oncology. Ed. Humana Press. Estados Unidos, 2008.

JAIN, S. *et al.*, «Development of an Antibody Functionalized Carbon Nanotube Biosensor for foodborne bacterial pathogens,» *Biosensor & Bioelectronics*, vol. S11, nº 002, pp. 1-7, 2012.

JANEGITZ, B. C. Desenvolvimento de biossensores utilizando nanotubos de carbono e nanopartículas de ouro. São Carlos: UFSCar, 126 f. 2012.

KHEIRI, F.; *et al.*, A novel amperometric immunosensor based on acetone-extracted propolis for the detection of the HIV-1 p24 antigen. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 26, p. 4457-4463, 2011.

LACERDA, M. V. *Clinical manifestations and pathogenesis of the thrombocytopenia in malaria* Brasilia: Universidade de Brasilia; 2007.

LIANG, W; BOCKRATH, M; PARK, H. Shell filling and exchange coupling in metallic single-walled carbon nanotubes. *Phys Rev Lett.* 2002 Mar 25;88(12):126801. Epub2002 Mar 6. PubMed PMID: 11909488.

LIU, S. *ET AL.*, Water dispersed multi-walled carbon nanotubes modified by tannin acid. *Materials Letters* (123) pp. 44–47, 2014

LJUNGSTRÖM, I. et al. Parasites. 1-92. In: *Methods in Malaria Research.*

4^a. ed. Manassas: MR4, American Type Culture Collection, University Boulevard, 2004. p.248.

LU, K. *et al.*, «Mechanical damage of carbon nanotubes by ultrasound,» *Carbon.* Vols. 1 de 2814-846, p. 34, 1996

MALARIA/SVS/MS: Malária in "Doenças de A a Z". 2009 [http://portalsaudegovbr/portal/saude/profissional/areacfm?id_area=1526].

SVS/Ministério da Saúde

MARIÚBA L. A. M. Desenvolvimento de um sistema em fluxo lateral para o diagnóstico de malária causada por *Plasmodium falciparum*. Universidade Federal do Amazonas, Manaus – AM, 2010.

MARTIN, S. K, et al. Unified parasite lactate dehydrogenase and

histidine- rich protein ELISA for quantification of Plasmodium falciparum. Am J Trop Med Hyg. 2009 Apr;80(4):516-22. PubMed PMID:19346368.

MARTINS, S. G. Determinação de lipopolissacarídeo em nanotubos de carbono não funcionalizados e funcionalizados. Santa Maria: Centro Universitário Franciscano, 63 f. 2011.

MEDEIROS, M. Z. Reagentes para diagnóstico: estratégias para a produção e desenvolvimento em bio-manguinhos. Escola nacional de saúde pública Sergio Arouca / Fundação Oswaldo Cruz, Mestrado profissional em gestão de C&T em saúde. Rio de Janeiro, 2004.

MIKAWA, A. Y. Desenvolvimento de teste imunocromatográfico para detecção de antígeno circulante do vírus da hepatite C. Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

MOODY, A. Rapid diagnostic tests for malaria parasites. Clinical microbiology reviews, p. 66-78, 2002.

MOUATCHO, J. C; GOLDRING, J. P. Malaria rapid diagnostic tests: challenges and prospects. Journal of medical microbiology. 2013;62(Pt 10):1491-505.

MURRAY, C. et al. Update on rapid diagnostic testing for Malaria. Clinical microbiology reviews, v. 21, n. 1, p. 97-110, 2008.

NOGUERA, P, et al. Carbon nanoparticles in lateral flow methods to detect genes encoding virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Anal Bioanal Chem.* 2011 Jan;399(2):831-8. Epub 2010 Oct 28. PubMed PMID:21046083;PubMed Central PMCID: PMC3015178.

ODOM, T. W. et al. Atomic structure and electronic properties of single-walled carbon nanotubes. *Nature*, vol. 391, pp. 62-64, 1998.

OLIVEIRA, M. R. F. Análise de custo-efetividade de teste rápido para o diagnóstico de casos novos de malária em doze municípios endêmicos do Estado do Pará. Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

PAYNE, D. Use and limitations of light microscopy for diagnosing malaria at the primary health care level, *66(7)*, 621–626. 1988.

PENNA-COUTINHO J. et al. Antimalarial activity of potential inhibitors of *Plasmodium falciparum* lactate dehydrogenase enzyme selected by docking studies. *PLoS One*;6(7):e21237. Epub 2011 Jul 14. PubMed PMID: 21779323; PubMed Central PMCID: PMC3136448. 2011.

PIPER, R. C. et al. Opportunities for improving pLDH-based malaria diagnostic tests. *Malar J.* 2011 Aug 1;10:213. PubMed PMID: 21806821; PubMed Central PMCID: PMC3163226.

RAUSH., J. *et al.*, «Surfactant assisted dispersion of functionalized multi-walled carbon nanotubes in aqueous media,» *Composites: Part A*, vol. 41,

pp. 1038-1046, 2010.

ROBERTSON, D. H; BRENNER, D. W; MINTMIRE, J. W. Energetics of nanoscale graphitic tubules. *Phys Rev B Condens Matter*. 1992 Jun 1;45(21):12592-12595. PubMed PMID: 10001304.

SIVEP – Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica / Malária. Boletim Epidemiológico. Malária: Monitoramento dos casos no Brasil em 2014. Vol. 46, N° 25, 2015.

SIVEP – Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica / Malária. Boletim Epidemiológico. Situação epidemiológica da malária no Brasil, 2012 e 2013. Vol. 46, N° 43, 2015

SHANMUCHARAJ, A., *et al.*, «Physical and chemical characteristics of multiwalled carbon nanotubes functionalized with aminosilane and its influence on the properties of natural rubber composites,» *Composites Science and Technology*, vol. 67, nº 9, pp. 1813-1822, 2007.

SPINATO, C. et al. Design of antibody-functionalized carbon nanotubes filled with radioactivable metals towards a targeted anticancer therapy. *Nanoscale* 8, 12626–12638, 2016.

TANGPUKDEE, N. et al. Malaria diagnosis: a brief review. *Korean J Parasitol.*, v. 47, n. 2, p. 93-102, 2009.

TAYLOR, B. J. et al. Real-time PCR detection of Plasmodium directly from

whole blood and filter paper samples. *Malar J.* 2011 Aug 19;10:244. PubMed PMID: 21851640; PubMed Central PMCID: PMC3171379

TIWARI, M. D. et al., Flow Cytometry-Based Evaluation and Enrichment of Multiwalled Carbon Nanotube Dispersions. *Langmuir* 28, 4939–4947, 2012.

TUINSTRA, F.; KOENIG, J. «Raman spectra of graphite,» *The Journal of Chemical Physics*, vol. 53, pp. 1126-1130, 1970.

TURKER, L. et al., Spectrophotometric behavior of polyvinylpyrrolindone in aqueous and nonaqueous media, *Colloid & Polymer science*, vol. 268, pp. 337-344, 1990.

US 20120070833A1. LATERAL FLOW MICROFLUIDIC ASSAYING DEVICE AND RELATED METHOD. United States.

YI, C. et al., «Covalent Conjugation of Multi-walled Carbon Nanotubes with proteins,» de *Carbon Nanotubes: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, Humana Press, 2010, pp. 9-17.

YU, P. et al., Polyethylene glycol modified magnetic carbon nanotubes as nanosorbents for the determination of methylprednisolone in rat plasma by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A.* 1348, 2014 pp.27–33.

WILLIAMS, G. S. et al. Immunophoretic rapid diagnostic tests as a source of immunoglobulins for estimating malaria sero-prevalence and transmission intensity. *Malar J.* 2009 Jul 22;8:168. PubMed PMID: 19624812; PubMed Central PMCID: PMC2720984

WO/2010/059687. A SEMICONDUCTOR FOR MEASURING BIOLOGICAL INTERACTIONS. WIPO Patent Application.

WONGSRICHANALAI, C. et al. A review of malaria diagnostic tools: microscopy and rapid diagnostic test (RDT). Am J Trop Med Hyg. 2007 Dec;77(6 Suppl):119- 27.

WHO – World Health Organization. Malaria rapid diagnostic test performance: results of WHO product testing of malaria RDTs: round 1 (2008).

WHO, Drug resistance: malaria. Disponível em: <<http://www.who.int/drugresistance/malaria/en/>>, acesso em 28 de junho de 2012.

WHO - World malaria report : 2011. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. ISBN 978 92 4 156440 3

WHO – World Health Organization. Rapid diagnostic tests: selection criteria. Disponível em: <http://www.who.int/malaria/diagnosis_treatment/diagnosis/RDT_selection_criteria.pdf>, acesso em 18/06/12.

WHO. WHO policy recommendation on malaria diagnostics in low transmission settings. 2014.

WHO, WHO malaria report: 2014. ISBN: 978 92 4 156483 0.
Disponível em:<
http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/144852/2/9789241564830_eng.pdf>,
acesso em 12/12/2014.

WONG, R. C; TSE, H. Y. Lateral flow immunoassay. Humana Press, 2009

WORKMAN, J. Handbook of organic compounds: NIR, IR, Raman, and UV–vis spectra featuring polymers and surfactants, vol. 3, New York: Academic Press, 2000.

XUE, C. *et al.*, Preparation of water-soluble multi-walled carbon nanotubes by polymer dispersant assisted exfoliation. Nanotechnology, pp. 7, 2008.