

Nanoimunoensaios para diagnóstico de malária

Nanoimmunoassays for malaria diagnosis

Inês Gomes

PhD. Instituto de Medicina Molecular, Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal. UCIBIO, REQUIMTE, Departamento de Química e Bioquímica, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Porto, Portugal
ines.gomes@fct.unl.pt

Ana Reis

UCIBIO, REQUIMTE, Departamento de Química, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade NOVA de Lisboa, Caparica, Portugal

Eulália Pereira

PhD, Professora Auxiliar. UCIBIO, REQUIMTE, Departamento de Química e Bioquímica, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Porto, Portugal

Elvira Fortunato

PhD, Professora Catedrática. CENIMAT/i3N, Departamento de Ciência dos Materiais, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade NOVA de Lisboa e CEMOP/Uninova, Caparica, Portugal

Miguel Prudêncio

PhD, Investigador FCT. Instituto de Medicina Molecular, Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

Ricardo Franco

PhD, Professor Auxiliar. UCIBIO, REQUIMTE, Departamento de Química, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade NOVA de Lisboa, Caparica, Portugal

Resumo

O desenvolvimento de Testes de Diagnóstico Rápido (TDR) para o diagnóstico de malária é uma área em intenso desenvolvimento.

Aqui, descrevemos dois nanoimunoensaios para a deteção do parasita da malária; um baseado em eletroforese em gel de agarose; e outro utilizando a tecnologia *lab-on-paper*.

Ambos os nanoimunoensaios usam nanopartículas de ouro (AuNP) funcionalizadas com o ácido 11-mercaptoundecanoico (MUA) ou com o pentapéptido CALNN, conjugadas com o anticorpo monoclonal (anti-*Pf*HRP2) que reconhece especificamente o antígeno de *Plasmodium falciparum* Histidine Rich Protein 2 (*Pf*HRP2).

A formação dos bionanoconjugados AuNP-anti-*Pf*HRP2 foi comprovada por eletroforese em gel de agarose, demonstrando que a funcionalização da AuNP e o modo de conjugação (por fisiosorção ou por reticulação química) controlam a ligação do anticorpo à AuNP.

O nanoimunoensaio baseado em gel de agarose, mostrou que os bionanoconjugados AuNP-MUA-anti-*Pf*HRP2 detetaram uma concentração de antígeno de 12 µg/mL, uma ordem de grandeza inferior à detetada pelos bionanoconjugados AuNP-CALNN-anti-*Pf*HRP2 (700 µg/mL).

Os bionanoconjugados AuNP-MUA-anti-*Pf*HRP2 também revelaram ser eficazes para a deteção colorimétrica direta do antígeno por Western Blot, eliminando a necessidade de um anticorpo secundário.

OTDR baseado na tecnologia *lab-on-paper* foi desenvolvido numa tira de papel de filtro à base de celulose, eliminando o tradicional invólucro de plástico. A quantidade de bionanoconjugados e os componentes das linhas de teste e de controlo foram otimizados. Futuramente, o nosso objetivo é aplicar este TDR na análise de amostras clínicas.

Palavras Chave:

Malária, Teste de Diagnóstico Rápido, deteção de antígeno, eletroforese em gel de agarose, tecnologia *lab-on-paper*.

Abstract

The development of Rapid Diagnostic Tests (RDTs) for malaria diagnosis is an area of intense research.

Here, we describe two nanoimmunoassays for malaria parasite detection; one based on agarose gel electrophoresis; and another employing *lab-on-paper* technology.

Both nanoimmunoassays use gold nanoparticles (AuNPs) functionalized with 11-mercaptoundecanoic acid (MUA) or with the pentapeptide CALNN, and further conjugated with a monoclonal antibody (anti-*Pf*HRP2) that specifically recognizes *Plasmodium falciparum* Histidine Rich Protein 2 (*Pf*HRP2) antigen.

The formation of AuNP-anti-*Pf*HRP2 bionanoconjugates was confirmed by agarose gel electrophoresis, demonstrating that AuNP functionalization and mode of conjugation (by physisorption or by chemical cross-linking) control antibody binding to AuNP.

The agarose gel-based nanoimmunoassay showed that AuNP-MUA-anti-*Pf*HRP2 bionanoconjugates could detect an antigen concentration of 12 µg/mL, one order of magnitude less than that detected by AuNP-CALNN-anti-*Pf*HRP2 bionanoconjugates (700 µg/mL).

AuNP-MUA-anti-*Pf*HRP2 bionanoconjugates were also shown to be effective for direct colorimetric detection of the antigen by Western Blot, eliminating the need for a secondary antibody.

The *lab-on-paper* technology-based RDT was developed on a filter cellulose filter paper-based strip, eliminating the traditional plastic casing. The amount of bionanoconjugates, and the components in test and control lines were optimized. In the future, our goal is to apply this RDT in the analysis of clinical samples.

Key Words:

Malaria, Rapid Diagnostic Test, antigen detection, agarose gel electrophoresis, *lab-on-paper* technology.

Introdução

A nanobiotecnologia aplicada à medicina tem especial interesse para diagnóstico molecular, especialmente para diagnóstico clínico, uma vez que possibilita a integração de diagnóstico com terapêutica, lançando as bases para uma abordagem de medicina personalizada. As aplicações de maior relevância são nas áreas da descoberta de novos biomarcadores, diagnóstico e tratamento de cancro, assim como na detecção de doenças infecciosas [1].

Neste trabalho, apresentamos dois métodos nanotecnológicos inovadores para o diagnóstico da malária, uma das doenças infecciosas de maior prevalência em todo o mundo.

A malária é causada por parasitas protozoários do género *Plasmodium* (*P.*), sendo uma das espécies, *P. falciparum*, responsável por elevados níveis de mortalidade e morbidade associados a esta doença. Ocorrem anualmente cerca de 6,6 milhões de casos de infeção por malária, sendo que em 2013 foram registadas 584.000 mortes, maioritariamente em África e entre os principais grupos de risco, nomeadamente, pacientes com VIH, grávidas e crianças com idade inferior a 5 anos [2].

A malária é transmitida principalmente em regiões tropicais e sub-tropicais onde a temperatura, humidade e a existência de águas paradas permitem a proliferação dos vetores, nomeadamente os mosquitos fêmea do género *Anopheles*. A infeção inicia-se quando o mosquito infetado pica o hospedeiro mamífero, injetando esporozoítos de *Plasmodium* na corrente sanguínea. Os esporozoítos atingem o fígado, infetando os hepatócitos, no interior dos quais se replicam num processo que culmina com a libertação de centenas de merozoítos na corrente sanguínea. Estes parasitas invadem os eritrócitos, conduzindo ao aparecimento dos sintomas desta doença [3]. Os sintomas habitualmente surgem 10 a 15 dias após a picada do mosquito e, à semelhança duma doença febril, os mais comuns incluem dores de cabeça, febre alta, calafrios, vômitos e mal-estar [2-5].

A semelhança entre os sintomas de malária e os de uma doença febril pode conduzir ao uso desnecessário de medicamentos anti-maláricos como os derivados de artemisinina, cloroquina, mefloquina, entre outros. É por isso de extrema importância que o diagnóstico de malária seja baseado na determinação da presença de parasitas no sangue e não nos sintomas da doença.

O método mais comum para a detecção de parasitas *Plasmodium* é a análise de esfregaços de sangue por microscopia ótica, considerado como "gold standard" do diagnóstico de malária. Contudo, os parasitas também podem ser detetados através de microscopia de fluorescência ou recorrendo a tecnologias de amplificação de ácidos nucleicos (PCR) [6]. Estes métodos apresentam diversas desvantagens, pois requerem laboratórios e equipamentos apropriados, técnicos especializados e tempo considerável para a análise, exigindo condições que são dificilmente acessíveis em países em vias

de desenvolvimento. Em alternativa, têm sido desenvolvidos os testes imunocromatográficos ou testes de diagnóstico rápido (TDR). São testes simples, rápidos, específicos, sensíveis e de baixo custo. São de fácil leitura e interpretação e não necessitam de infraestruturas de apoio, o que os torna vantajosos em países com poucos recursos [6-9].

Os TDR disponíveis comercialmente permitem detetar diferentes antígenos de *Plasmodium*, tais como: Histidine Rich Protein 2 (HRP2), Lactate Dehydrogenase (pLDH) e aldolase. No entanto, estes testes também apresentam limitações; a HRP2 (somente expressa em *P. falciparum*) é detetada em circulação várias semanas após a eliminação dos parasitas, o que pode conduzir a falsos positivos. A pLDH e a aldolase (produzidas por todas as espécies do género *Plasmodium*) são menos sensíveis como biomarcadores de infeção por *Plasmodium*, comparativamente com os testes para a detecção de HRP2, mas têm a vantagem de serem rapidamente eliminados da circulação após tratamento conducente à eliminação dos parasitas. A sensibilidade dos TDR pode ser grandemente afetada pelas condições climáticas como a humidade e o calor. Podem também gerar falsos positivos, devido a reações cruzadas em pacientes com artrite reumatoide ou outras condições que apresentem auto-anticorpos circulantes [7,8,10]. Devido a todas estas limitações, torna-se urgente a identificação de um novo biomarcador de malária, assunto atualmente também em estudo pelo nosso grupo de investigação.

Os TDR são geralmente dispositivos imunocromatográficos de fluxo lateral que usam nanopartículas de ouro (AuNP) conjugadas com um anticorpo específico que reconhece o antígeno alvo. Normalmente usam uma membrana de nitrocelulose como suporte no qual se imobilizam as componentes das linhas de teste e de controlo (Figura 1 A). O teste apresenta uma pequena janela para visualização dos resultados e encontra-se protegido por um invólucro de plástico (Figura 1 B). Esta tecnologia tem sido empregue noutros ensaios de diagnóstico, onde se destacam os testes de gravidez [9,11]. Contudo a nitrocelulose sendo um material com propriedades hidrófobas de forma a poder ser utilizado nestes testes, necessita de sofrer um tratamento superficial, caso contrário não ocorre a difusão das soluções líquidas, sendo esta desvantagem superada pela celulose que é intrinsecamente um material hidrófilo.

As AuNP são candidatas ideais ao desenvolvimento de bioensaios, devido às suas propriedades únicas, tais como possibilidade de controlo de tamanho através de síntese química simples, facilidade de preparação, elevada área superficial e fácil funcionalização que possibilita elevada solubilidade em água e cor intensa. As AuNP proporcionam um nano-ambiente favorável à imobilização de biomoléculas (anticorpos), mantendo a atividade biológica destas. A funcionalização das AuNP oferece a oportunidade de criar superfícies complementares e interações multivalentes para um reconhecimento biomolecular eficiente. Os ligandos baseados

em alcanotióis, tais como o ácido 11-mercaptoundecanóico (MUA) ou o pentapéptido Cys-Ala-Leu-Asn-Asn (CALNN), provaram ser moléculas extremamente eficazes para a funcionalização, uma vez que proporcionam uma interface simples, flexível, conveniente e promovem uma ligação forte entre os anticorpos e a superfície da AuNP [1,12,13]. O pentapéptido CALNN possui um grupo tiol na cadeia lateral do N-terminal da cisteína (C) que permite formar uma ligação covalente à superfície do ouro; alanina (A) e leucina (L) que possuem cadeias laterais hidrofóbicas, promovendo a auto-montagem do péptido; e dois resíduos hidrofílicos não-carregados de asparagina (N) que interagem com o anticorpo [14].

A conjugação entre o anticorpo e a AuNP poderá ocorrer por fissorção (ligação eletrostática) ou por quimissorção (ligação covalente), neste caso recorrendo a reticulação entre o anticorpo e o ligando de funcionalização superficial das AuNP.

No presente estudo descrevemos o desenvolvimento de dois nanoimunoensaios para diagnóstico de malária: (i) baseado em eletroforese em gel de agarose; e (ii) TDR que recorre à tecnologia *lab-on-paper*.

Estes nanoimunoensaios têm como base o uso de AuNP funcionalizadas com MUA ou CALNN e conjugadas com o anticorpo monoclonal anti-*Pf*HRP2, que reconhece especificamente o antígeno de *P. falciparum* Histidine Rich Protein 2 (*Pf*HRP2).

Eletroforese em Gel de Agarose

A eletroforese em gel de agarose é uma técnica clássica de análise de biomoléculas, que permite caracterizar nanopartículas

isoladas ou conjugadas com biomoléculas, tais como ácidos nucleicos, proteínas e anticorpos [15-18].

Os géis de agarose são facilmente preparados, encontram-se livres de componentes tóxicos (ao contrário dos géis de poli(acrilamida)), e permitem a migração das AuNP e conjugados em direção ao eletrodo de carga oposta, com diferentes velocidades de migração [15]. As distâncias migradas no final do tempo de corrida do gel, que se traduzem em mobilidades eletroforéticas (μ), dependem da relação carga/massa das partículas. Assim, considerando AuNP com carga superficial negativa uniforme, as mobilidades eletroforéticas dos respetivos conjugados com anticorpos, estão diretamente relacionadas com a massa de anticorpo adsorvido à superfície das AuNP [18]. Posteriormente, após a adição de antígeno aos conjugados AuNP-anticorpo, será possível determinar a quantidade de antígeno ligado por análise das mobilidades eletroforéticas dos conjugados AuNP-anticorpo-antígeno. Pode assim construir-se uma reta de calibração que será a base para um método de deteção de antígeno.

TDR em plataforma *lab-on-paper*

O TDR proposto foi impresso numa tira de papel de filtro Whatman N° 1 segundo a tecnologia *lab-on-paper*.

Esta tecnologia foi introduzida em 2007 pelo grupo de investigação de George Whitesides da Universidade de Harvard [19], tendo sido otimizada no CENIMAT-i3N, FCT-UNL [20]. O papel é um substrato atrativo pois é um material resistente, leve, que por ser feito de celulose é compatível

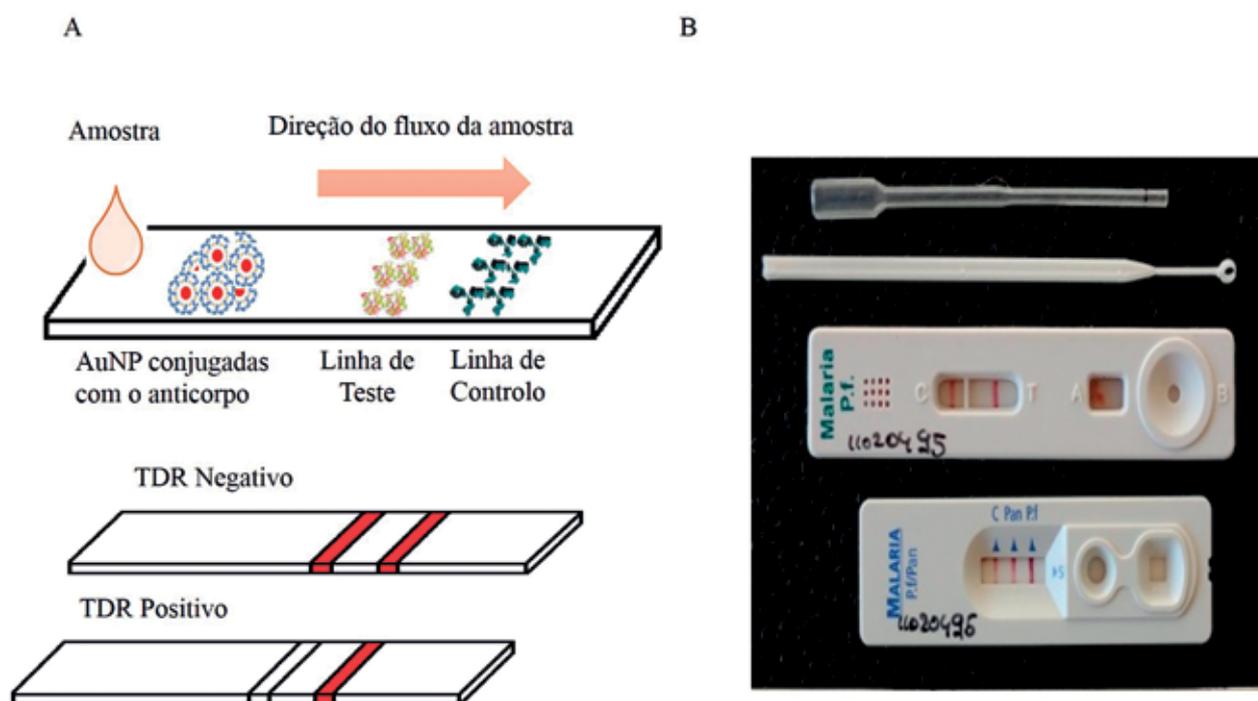


Figura 1 – Testes de diagnóstico rápido. (A) Constituição e modo de funcionamento de um TDR baseado num ensaio competitivo; (B) Exemplos de TDR comerciais para deteção de malária em amostras de sangue (consultado em www.malwest.gr, a 24 de julho de 2015).

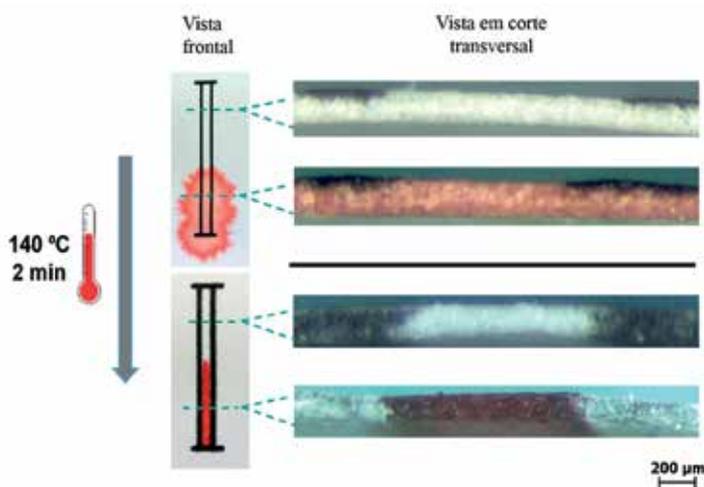


Figura 2 – Imagens de microscopia ótica da secção transversal do papel, antes e depois da difusão da cera através de toda a espessura do papel. A fim de realçar o efeito das barreiras hidrofóbicas foi utilizada uma solução de corante vermelho.

com amostras biológicas. Além disso apresenta um baixo custo, comparativamente com a nitrocelulose, o suporte mais comum em TDR [19,20]. A tecnologia *lab-on-paper* tem sido grandemente aplicada na detecção de glicose, ácidos nucleicos de *Mycobacterium tuberculosis* e anticorpos *anti-Leshmania*. A sua aplicação tem também sido promissora nas áreas da qualidade alimentar e da monitorização ambiental [19,20].

A tecnologia *lab-on-paper* baseia-se num método simples e não dispendioso de padronização do papel, formando canais delimitados por um polímero hidrofóbico. O método usa uma impressora convencional com tinteiros de cera e uma placa de aquecimento. O padrão desejado é impresso em cera na superfície do papel, e através do uso de uma placa de aquecimento, a cera derrete e difunde ao longo da espessura do papel, criando barreiras hidrofóbicas que definem canais hidrofílicos e zonas de reação (linha de teste e linha de controlo), tal como ilustra a figura 2.

A aplicação desta tecnologia ao TDR para diagnóstico de malária será vantajosa comparativamente com os testes disponíveis comercialmente, pois elimina-se a necessidade do invólucro de plástico e usa-se um pequeno volume de amostra, o que diminui o seu custo. Estas condições sugerem a aplicação deste TDR em amostras clínicas, assim como seria interessante provar a sua aplicabilidade nas condições adversas de diagnóstico "*point-of-care*".

Materiais e métodos

Reagentes

O anticorpo monoclonal anti-*Pf*HRP2 foi obtido comercialmente da empresa antibodies-online GmbH. O anticorpo secundário, anti-IgG de rato foi adquirido a Sigma-Aldrich

e os reagentes usados nos géis de SDS-PAGE foram de BIO-RAD. A agarose UltraPura (Invitrogen) foi usada nos géis de agarose. As membranas de nitrocelulose foram de Life Sciences. O papel de filtro foi papel de cromatografia Whatman N° 1. Todos os outros reagentes químicos foram de Sigma-Aldrich, com elevado grau de pureza.

Síntese e Funcionalização de AuNP

As nanopartículas de ouro com um diâmetro médio de 13 nm foram sintetizadas pelo método de redução de um sal de ouro pelo citrato de sódio. Este método foi originalmente descrito por Turkevich [21] e posteriormente otimizado por Plech e colaboradores [22].

A concentração da solução coloidal de AuNP foi determinada por espectrofotometria de UV-visível como anteriormente descrito [23].

De forma a uniformizar a carga negativa da superfície das AuNP e facilitar a conjugação com o anticorpo, o revestimento de citrato de sódio proveniente da síntese foi substituído pelo ácido 11-mercaptoundecanoico (MUA) ou pelo pentapéptido CALNN. A solução coloidal de AuNP foi incubada durante 2 horas à temperatura ambiente com MUA, numa razão molar 1:5000 e com CALNN num período de 16 horas numa razão molar de 1:1000. As partículas funcionalizadas foram submetidas a ciclos de centrifugação/ressuspensão de forma a remover o ligando que não reagiu.

As AuNP funcionalizadas foram caracterizadas por espectrofotometria de UV-visível num intervalo de comprimento de onda de 300 a 900 nm e por eletroforese em gel de agarose.

Preparação dos bionanoconjugados AuNP-anticorpo e AuNP-anticorpo-antigénio

A formação dos bionanoconjugados AuNP-MUA ou AuNP-CALNN com o anticorpo anti-*Pf*HRP2 (AuNP-MUA-anti-*Pf*HRP2 ou AuNP-CALNN-anti-*Pf*HRP2) foi realizada na presença e na ausência dos agentes de reticulação EDC (cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida e NHS (N-hidroxisuccinimida). As soluções de EDC e NHS foram preparadas pela dissolução dos respetivos sais em água milli-Q, obtendo-se num volume final de 1 mL, uma concentração de EDC e de NHS de 1 mM e 2 mM respetivamente. As soluções aquosas de EDC/NHS foram incubadas com as AuNP funcionalizadas, durante 1 hora, à temperatura ambiente.

Adicionaram-se diferentes razões molares de anticorpo anti-*Pf*HRP2 a AuNP-MUA ou AuNP-CALNN a 1nM para os estudos de eletroforese em gel de agarose ou a 2,5 nM para o desenvolvimento do TDR. Os conjugados foram incuba-

dos durante 16 horas a 4 °C. Na presença de EDC/NHS, os conjugados foram incubados durante 2 horas à mesma temperatura. Após a conjugação, o anticorpo não ligado foi removido por centrifugação e o sedimento foi ressuspendido numa solução de albumina de soro de bovino (BSA), 10 mg/mL e incubado durante 1 hora no escuro. Desta forma, são impedidas as ligações não específicas, aquando da ligação do antígeno aos conjugados AuNP-anticorpo.

Após este passo de bloqueio com BSA, os conjugados foram submetidos a 2 ciclos de centrifugação/lavagem com tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 7,2.

No caso da formação de bionanoconjugados AuNP-anticorpo-antígeno, incubaram-se diferentes concentrações de antígeno recombinante PfHRP2 com a mesma razão molar de anticorpo, durante 2 horas a 4 °C. Seguidamente as amostras foram novamente centrifugadas/lavadas com tampão fosfato de sódio, 5 mM, pH 7,2.

Produção e purificação do antígeno recombinante PfHRP2

A produção e purificação da proteína foram realizadas segundo o procedimento adaptado de Ndonwi *et al.* [24]. Inicialmente foi inserida a sequência de ADN do PfHRP2 contendo uma cauda de 6 histidinas no vetor pET15b. Este plasmídeo foi introduzido em células hospedeiras de *E.coli* BL21/DE3 para expressão da proteína PfHRP2 recombinante. As culturas bacterianas cresceram a 37 °C durante 16 horas e foram transferidas para 2 L de meio LB, no qual cresceram a 37 °C até uma densidade ótica a 600 nm entre 0,75 e 0,9. Neste ponto, foi adicionada uma solução de IPTG 0,05 mM para promover a sobreexpressão da proteína e a cultura incubou durante 20 horas a 16 °C. As culturas foram centrifugadas e posteriormente lisadas por *French press*. Após obtenção do lisado bacteriano, purificou-se a proteína PfHRP2 por cromatografia de afinidade, usando uma resina de Ni-NTA.

A concentração da proteína foi estimada pelo método do ácido bicinonínico (BCA) [25] e a sua pureza foi avaliada por eletroforese em gel de SDS-PAGE.

Eletroforese em gel de agarose

Os bionanoconjugados AuNP-anticorpo preparados como anteriormente descrito, foram centrifugados (22 000 x g, 10 minutos, a 4 °C) e o sedimento ressuspendido em 13,5 µl de tampão fosfato de sódio, 5 mM, pH 7,2, e 1,5 µl de glicerol (99,5%). As amostras foram aplicadas num gel de agarose a 0,5% em tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA), pH 8,5. O gel correu durante 30 a 40 minutos a 150 V num sistema de eletroforese ENDURO (Labnet).

A mobilidade eletroforética (μ) foi calculada de acordo

com a equação 1, que representa o quociente entre a velocidade de migração das amostras (v) e o campo elétrico aplicado (E) [26].

$$\mu = \frac{v}{E} \quad (\text{equação 1})$$

Western Blot com deteção pelos conjugados AuNP-anticorpo

O ensaio de Western Blot foi efetuado para se comprovar o reconhecimento do antígeno recombinante PfHRP2 pelos conjugados AuNP-anticorpo anti-PfHRP2.

O antígeno recombinante a 1,5 mg/mL foi inicialmente separado por eletroforese em gel de SDS-PAGE a 10%, e seguidamente transferido para a membrana de nitrocelulose através do sistema Mini-PROTEAN Tetra (BIO-RAD). A membrana de nitrocelulose foi bloqueada com uma solução de BSA a 10 mg/mL durante 20 minutos, com agitação lenta. Após este período a membrana foi incubada com a solução de bionanoconjugados AuNP-MUA-anti-PfHRP2 durante 2 horas, com agitação lenta à temperatura ambiente e posteriormente lavada 3 vezes com o tampão PBST (tampão PBS com 0,05% de Tween 20) durante 5 minutos.

Projeção do teste de diagnóstico rápido usando a tecnologia *lab-on-paper*

O teste foi projetado no programa informático Adobe Illustrator CC. Os testes foram compostos por uma zona de deposição dos bionanoconjugados, uma linha de teste, uma linha de controlo e uma zona de lavagem. Os testes foram impressos em papel de filtro (Whatman Cellulose Chromatography Paper Grade 1) com recurso a uma impressora com tinteiros de cera (Xerox ColorQube 8570). Seguidamente os testes foram difundidos numa placa de aquecimento (Robax) durante 2 minutos a 140 °C para que ocorresse a difusão vertical da cera pelo papel, formando-se barreiras hidrofóbicas que definem os canais hidrofílicos para a deposição das amostras (Figura 3).

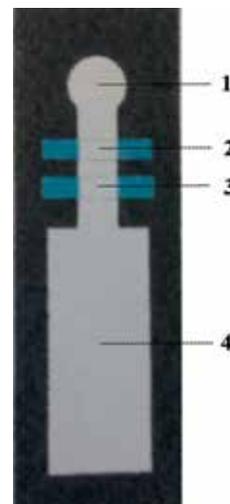


Figura 3 – Tira de papel de filtro Whatman N° 1 desenhada segundo a tecnologia *lab-on-paper* para o desenvolvimento do TDR.

Legenda:

1. Zona de deposição dos bionanoconjugados
2. Linha de teste
3. Linha de controlo
4. Zona de lavagem

Teste de diagnóstico rápido (TDR)

No desenvolvimento do TDR foi realizada a otimização da linha de teste, da linha de controlo e do volume de bionanoconjugados a serem aplicados.

Para a otimização da linha de teste foram testados volumes de 2 a 6 μL de antígeno recombinante *Pf*HRP2 num intervalo de concentrações de 0,6 mg/mL a 1,5 mg/mL. Na linha de controlo foram aplicados 2,5 μL de anticorpo secundário (anti-IgG de rato) sem diluição (concentração de 11 mg/mL) e até uma diluição de 1:100 ou 1:200 em presença de bionanoconjugados AuNP-MUA-anti-*Pf*HRP2 ou AuNP-CALNN-anti-*Pf*HRP2 respetivamente. O volume da solução de bionanoconjugados a 12 nM foi testado entre 30 e 70 μL .

Para que as soluções aplicadas ficassem confinadas às linhas respetivas, foi necessário levantar as respetivas linhas de ensaio com o auxílio de um clipe, para que a solução de antígeno recombinante a aplicar na linha de teste ou a solução de anti-IgG de rato a aplicar na linha de controlo não migrasse imediatamente ao longo da tira de papel de filtro. Após secagem das soluções à temperatura ambiente, o clipe foi retirado e para a realização do teste adicionou-se então a solução de bionanoconjugados. Esta migrou por capilaridade ao longo do papel, tal como pretendido.

Sendo um TDR em formato competitivo, no caso de um teste negativo, o antígeno que reveste a linha de teste liga-se ao bionanoconjugado AuNP-anticorpo, concentrando a cor vermelha e formando uma linha visível. No caso de um teste positivo, o conjugado AuNP-anticorpo apresenta antígeno ligado (proveniente da amostra de ensaio), pelo que não se ligará à linha de teste, permanecendo esta incolor. Na linha de controlo, o anticorpo secundário anti-IgG liga-se ao bionanoconjugado AuNP-anticorpo, formando uma linha vermelha, independentemente da presença do antígeno alvo, o que demonstra o correto funcionamento do teste.

As imagens apresentadas foram adquiridas com uma câmara fotográfica digital Nikon COOLPIX L16 ou com um iPhone 5 (Apple).

Resultados e discussão

Eletroforese em gel de agarose

Formação de bionanoconjugados com anticorpo

A formação dos bionanoconjugados AuNP-MUA-anti-*Pf*HRP2 ou AuNP-CALNN-anti-*Pf*HRP2 e a sua otimização para a deteção do antígeno foi estudada por eletroforese em gel de agarose.

As AuNP funcionalizadas foram conjugadas com o anticorpo monoclonal numa razão molar de 0 a 40 por adsorção direta (ligação eletrostática) ou por reticulação química usando EDC/NHS (ligação covalente).

Os resultados obtidos mostraram que em todos os casos estudados ocorreu uma diminuição da mobilidade eletroforética à medida que uma maior concentração de anticorpo foi conjugado com as AuNP-MUA ou AuNP-CALNN, até uma razão molar de cerca de 20 anticorpos por AuNP, a partir da qual ocorreu uma estabilização do valor da mobilidade eletroforética.

Comparando os resultados obtidos para bionanoconjugados AuNP-MUA-anti-*Pf*HRP2 ou AuNP-CALNN-anti-*Pf*HRP2, observou-se na presença de MUA, um maior arrastamento das bandas de conjugados, relativamente aos conjugados funcionalizados com CALNN, o que pode ser devido a uma ligação mais fraca do anticorpo anti-*Pf*HRP2 às AuNP-MUA comparativamente com as AuNP-CALNN (dados não apresentados).

Os géis de agarose de bionanoconjugados AuNP-CALNN-anti-*Pf*HRP2 na presença ou ausência de EDC/NHS são ilustrados na figura 4.

Os conjugados formados por ligação eletrostática (Figura 4 A) apresentaram uma maior diferença de mobilidade eletroforética a partir da razão molar de 5 até à razão molar de 20. Razões molares superiores a 20, mostraram a mesma distância de migração.

Nos conjugados formados por ligação covalente (Figura 4 B), observou-se uma diminuição de mobilidade eletroforética a partir da razão molar de 2,5 até à razão molar de 20, estabilizando a este valor para razões molares superiores. Também se observou um menor arrastamento das bandas de conjugados o que permite inferir que na presença dos agentes de reticulação EDC/NHS, são formados bionanoconjugados mais compactos e robustos, do que na ausência destes. A análise destes géis de agarose permite concluir que são necessárias cerca de 20 moléculas de anticorpo por cada AuNP funcionalizada em solução, para se formar uma coroa compacta de anticorpo em torno da AuNP. Assim, para garantir a formação de conjugados com revestimento total com o anticorpo, usou-se uma razão molar de 25 anticorpos por cada AuNP funcionalizada em solução, aquando do desenvolvimento do TDR.

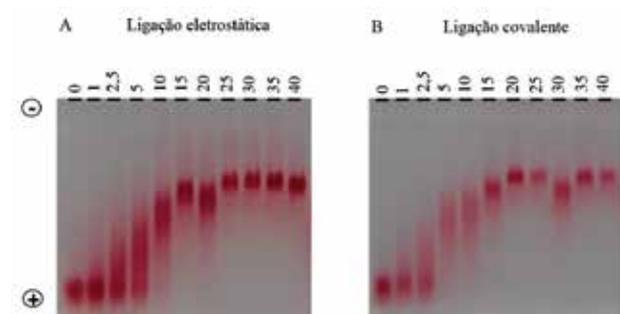


Figura 4 – Eletroforese em gel de agarose de bionanoconjugados AuNP-CALNN-anti-*Pf*HRP2. (A) Conjugados formados por ligação eletrostática; (B) Conjugados formados por ligação covalente. As razões molares [anti-*Pf*HRP2]/[AuNP-CALNN] são indicadas em cada poço. Os sinais "+" e "-" indicam a polaridade dos elétrodos.

Deteção de antígeno recombinante

As nanopartículas funcionalizadas (AuNP-MUA ou AuNP-CALNN) foram conjugadas com o anticorpo anti-*Pf*HRP2 numa razão molar de 25 por ligação eletrostática ou covalente e seguidamente incubadas com diferentes concentrações de antígeno recombinante *Pf*HRP2.

Da análise dos géis de agarose obtidos com estes bionanoconjugados incubados com antígeno, concluiu-se que a deteção de antígeno recombinante só foi conseguida para os bionanoconjugados AuNP-anticorpo formados na presença dos agentes de reticulação EDC/NHS, uma vez que estes conferem uma maior estabilidade aos bionanoconjugados [27]. Nos bionanoconjugados baseados em AuNP-MUA observou-se uma diminuição da mobilidade eletroforética até cerca de $-0,92 \mu\text{m cm/V s}$, que corresponde a uma concentração em antígeno de $12 \mu\text{g/mL}$, sendo que a partir desta concentração ocorreu uma estabilização da mobilidade eletroforética até concentrações de antígeno de pelo menos $100 \mu\text{g/mL}$ (Figura 5 A). Na presença de bionanoconjugados funcionalizados com CALNN, observou-se uma diminuição de mobilidade eletroforética à medida que a concentração de antígeno aumenta, até cerca de $-1,1 \mu\text{m cm/V s}$, correspondendo a $700 \mu\text{g/mL}$ de *Pf*HRP2, estabilizando neste valor para concentrações de antígeno superiores e até cerca de $1000 \mu\text{g/mL}$ (Figura 5 B). Observa-se assim, que na presença dos bionanoconjugados AuNP-CALNN-anti-*Pf*HRP2 é possível detetar concentrações de antígeno recombinante *Pf*HRP2 cerca de uma ordem de grandeza superior à detetável em presença de bionanoconjugados AuNP-MUA-anti-*Pf*HRP2. Tal propriedade pode

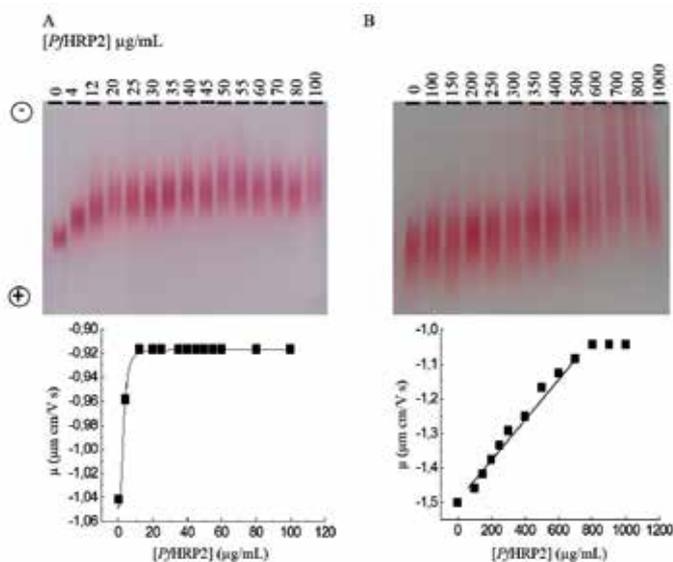


Figura 5 – Eletroforese em gel de agarose de bionanoconjugados formados na presença de EDC/NHS com diferentes concentrações de antígeno recombinante *Pf*HRP2 (indicadas em cada poço).

(A) Eletroforese em gel de agarose de AuNP-MUA-anti-*Pf*HRP2 incubados com diferentes concentrações de antígeno *Pf*HRP2 e respetiva mobilidade eletroforética; (B) Eletroforese em gel de agarose de AuNP-CALNN-anti-*Pf*HRP2 incubados com diferentes concentrações de antígeno *Pf*HRP2 e respetiva mobilidade eletroforética. Os sinais "+" e "-" indicam a polaridade dos elétrodos.

dever-se ao facto do pentapéptido CALNN promover uma ligação mais favorável entre o anticorpo e a AuNP, o que por sua vez pode favorecer a ligação de maiores quantidades de antígeno *Pf*HRP2 [28,29].

Deteção de antígeno em sobrenadantes de culturas de sangue humano infetado com *Pf*HRP2

As nanopartículas funcionalizadas (AuNP-MUA ou AuNP-CALNN) foram conjugadas com o anticorpo anti-*Pf*HRP2 numa razão molar de 25 por ligação covalente e incubadas com diferentes concentrações de sobrenadante de cultura de sangue humano infetado com *Pf*HRP2 e de cultura não infetada.

Os resultados obtidos indicam que não há diferença de mobilidade eletroforética entre as diferentes concentrações de sobrenadante de culturas de sangue humano infetado ou não infetado (amostra controlo). Estes resultados podem indicar que não ocorreu ligação do antígeno existente nas culturas de sangue ao anticorpo que reveste as nanopartículas funcionalizadas, o que se pode dever a uma baixa concentração do parasita ou à composição do meio de cultura onde o parasita se mantém. Este meio de cultura maioritariamente rico em eritrócitos e albumina de soro de bovino [30], pode ser prejudicial à ligação do anticorpo ao antígeno.

Western Blot para deteção do antígeno recombinante *Pf*HRP2

A análise por Western Blot foi realizada para confirmar que o antígeno recombinante *Pf*HRP2 pode ser reconhecido pelo anticorpo monoclonal anti-*Pf*HRP2 conjugado com as AuNP funcionalizadas com MUA.

Os resultados obtidos mostraram a presença de uma banda vermelha a cerca de 50 kDa, correspondente ao reconhecimento da proteína *Pf*HRP2 em estudo [24]. Verifica-se assim que o uso de bionanoconjugados AuNP-MUA-anti-*Pf*HRP2 revelou ser um método eficaz para a deteção, uma vez que a proteína alvo foi detetada diretamente na membrana de nitrocelulose pelo uso de um anticorpo específico (anti-*Pf*HRP2) presente à superfície das AuNP. Este mostrou ser um método de revelação mais rápido, mais simples e mais económico, comparativamente com a quimioluminescência, o método mais comum em Western Blot. Este último requer o uso de um anticorpo secundário, substrato de quimioluminescência, película fotográfica e equipamento de revelação. As AuNP aqui presentes são facilmente sintetizadas, apresentam um baixo custo, têm uma elevada área superficial que permite a fácil conjugação com os anticorpos e permite uma simples visualização e interpretação dos resultados através do aparecimento de bandas vermelhas. Um estudo semelhante foi anteriormente realizado por alguns de nós para a identificação de um outro antígeno de malária (*Pf*Hsp70) [18].

Teste de Diagnóstico Rápido usando a tecnologia *lab-on-paper*

Para o desenvolvimento do teste de diagnóstico rápido foi necessário otimizar o volume e a concentração de antígeno recombinante *Pf*HRP2 a adicionar à linha de teste, a diluição de anticorpo secundário (anti-IgG) a aplicar na linha de controlo, assim como a quantidade (controlada pelo volume de solução adicionado) de bionanoconjugados AuNP-MUA-anti-*Pf*HRP2 ou AuNP-CALNN-anti-*Pf*HRP2 a aplicar na zona de deposição.

Aplicação dos bionanoconjugados no TDR

O volume de bionanoconjugados AuNP-MUA-anti-*Pf*HRP2 ou AuNP-CALNN-anti-*Pf*HRP2 a 12 nM variou entre 30 e 70 μ l, de modo a determinar o volume necessário a ser aplicado na zona de deposição dos bionanoconjugados e a sua capacidade de migração ao longo do teste. Observou-se que 60 μ l é o volume ideal a ser aplicado para que os bionanoconjugados migrem ao longo da tira de papel de filtro, e reconheçam o antígeno e o anticorpo secundário imobilizados na linha de teste e de controlo, respetivamente.

Otimização da linha de teste

A concentração de antígeno recombinante *Pf*HRP2 foi avaliada num intervalo de 0,6 a 1,5 mg/mL. Verificou-se que somente com a concentração mais alta, correspondente a 1,5 mg/mL é que foi possível detetar uma cor vermelha visível na linha de teste. Este resultado indica que ocorreu

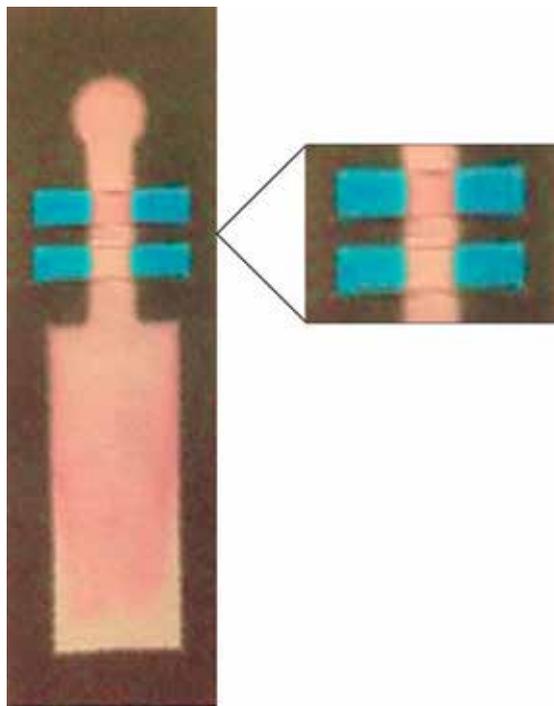


Figura 6 – Detecção do antígeno recombinante *Pf*HRP2 em tira de papel de filtro. Aplicação de 2,5 μ l de antígeno a 1,5 mg/mL e 60 μ l de bionanoconjugados AuNP-CALNN-anti-*Pf*HRP2 a 12 nM.

ligação entre o antígeno imobilizado na linha de teste e o anticorpo anti-*Pf*HRP2 conjugado com as AuNP funcionalizadas (com CALNN ou MUA) que migraram ao longo da tira de papel de filtro.

Também foi variado o volume de solução de antígeno recombinante *Pf*HRP2 a imobilizar na linha de teste num intervalo de 2 a 6 μ l. Os resultados obtidos mostraram que 2,5 μ l é o volume ideal a ser aplicado, uma vez que volumes de antígeno superiores a este tornam-se excessivos para a capacidade de absorção do papel de filtro na linha de teste. Assim, verificou-se que o volume de 2,5 μ l de antígeno a uma concentração de 1,5 mg/mL são as condições favoráveis a serem aplicadas de modo a que o antígeno seja detetado, tal como ilustra a figura 6.

Otimização da linha de controlo

Na linha de controlo foram aplicados 2,5 μ l de anticorpo secundário (anti-IgG) numa gama de diluições até 1:100 para os bionanoconjugados AuNP-MUA-anti-*Pf*HRP2 ou 1:200 no caso de bionanoconjugados AuNP-CALNN-anti-*Pf*HRP2. O volume aplicado de 2,5 μ l foi selecionado de acordo com os resultados obtidos na linha de teste.

Na presença de bionanoconjugados AuNP-CALNN-anti-*Pf*HRP2, a linha de controlo apresentou uma cor vermelha visível até uma diluição de anti-IgG de 1:90. A partir desta diluição, a linha de controlo ainda é detetada, embora com menor nitidez, deixando de o ser em presença de diluições superiores (1:200), tal como ilustrado na figura 7 A. Nos bionanoconjugados AuNP-MUA-anti-*Pf*HRP2 uma cor vermelha visível está presente até à diluição de 1:45, não sendo detetáveis diluições de anticorpo secundário superiores (Figura 7 B).

A partir dos resultados obtidos foi selecionada para o desenvolvimento do TDR a diluição de anti-IgG de 1:90 e 1:45 em presença dos bionanoconjugados AuNP-CALNN-anti-*Pf*HRP2 e AuNP-MUA-anti-*Pf*HRP2, respetivamente.

Uma maior diluição foi conseguida na presença das nanopartículas funcionalizadas com CALNN comparativamente

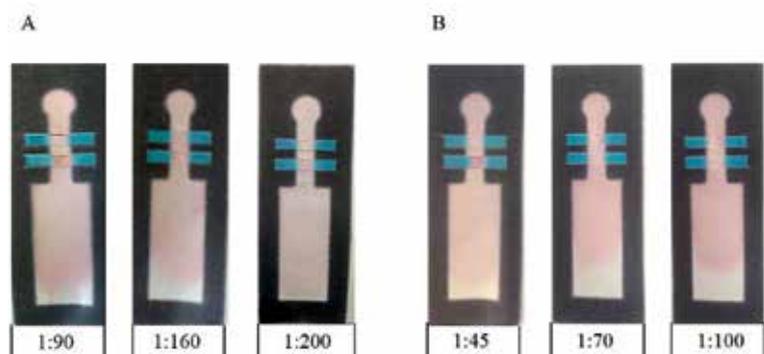


Figura 7 – Diluições de anticorpo secundário (anti-IgG) aplicadas na linha de controlo das tiras de papel de filtro. (A) Diluições de anti-IgG aplicadas na linha de controlo em presença de 60 μ l de bionanoconjugados AuNP-CALNN-anti-*Pf*HRP2 a 12 nM; (B) Diluições de anti-IgG aplicadas na linha de controlo em presença de 60 μ l de bionanoconjugados AuNP-MUA-anti-*Pf*HRP2 a 12 nM.

com as nanopartículas funcionalizadas com MUA, provavelmente devido ao facto do pentapéptido CALNN favorecer a ligação do anticorpo à AuNP e por conseguinte favorecer a ligação deste ao anticorpo secundário imobilizado na linha de controlo. Uma maior diluição de anticorpo secundário na linha de controlo torna-se vantajosa, uma vez que permite o desenvolvimento de um teste mais económico.

Conclusões

O presente trabalho descreve a possibilidade de deteção do antígeno recombinante *PfHRP2*, proveniente do parasita da malária *Plasmodium falciparum*, usando dois nanoimunoensaios diferentes: (i) eletroforese em gel de agarose; e (ii) teste de diagnóstico rápido (TDR) com recurso à tecnologia *lab-on-paper*.

Pelos resultados apresentados é possível concluir que 20 moléculas de anticorpo em solução por cada AuNP funcionalizada são suficientes para a formação de bionanoconjugados estáveis. No entanto, os melhores resultados foram obtidos para AuNP funcionalizadas com CALNN e conjugadas por ligação covalente ao anticorpo monoclonal anti-*PfHRP2*, o que permite concluir que a funcionalização e o modo de conjugação (eletrostática ou covalente) controlam a ligação do anticorpo à nanopartícula, com implicações na formação de bionanoconjugados mais compactos e robustos.

A eletroforese em gel de agarose permitiu comprovar a formação dos bionanoconjugados e a deteção do antígeno em estudo. A deteção do antígeno recombinante *PfHRP2*, recorrendo a esta metodologia, só foi conseguida em presença de bionanoconjugados preparados por ligação covalente, devido à sua maior estabilidade em comparação com os preparados por ligação eletrostática. Foi possível detetar cerca de 12 µg/mL de antígeno em presença de bionanoconjugados AuNP-MUA-anti-*PfHRP2* e 700 µg/mL em presença dos conjugados AuNP-CALNN-anti-*PfHRP2*. Conclui-se que aproximadamente 60 vezes mais antígeno foi detetado com os bionanoconjugados AuNP-CALNN-anti-*PfHRP2*, o que demonstra que o pentapéptido CALNN favorece a ligação do anticorpo à AuNP, e consequentemente a ligação do antígeno.

Recorrendo a eletroforese em gel de agarose, não foi possível detetar o antígeno a partir do sobrenadante de culturas de sangue humano infetado, possivelmente devido à baixa concentração do parasita ou à composição do meio de cultura onde este se encontra, que pode prejudicar a ligação anticorpo-antígeno.

Os resultados provenientes da análise por Western Blot mostraram que o antígeno recombinante *PfHRP2* foi especificamente reconhecido pelos bionanoconjugados. A utilização de uma solução de bionanoconjugados mostrou ser um método de revelação rápido, sensível e de fácil visualização e interpretação. Trata-se de um método menos dispendioso e

menos demorado comparativamente com o método de revelação indireto, a quimioluminescência, comum em Western Blot.

O TDR proposto tem como superfície de teste uma tira de papel de filtro desenhada segundo a tecnologia *lab-on-paper*, em que 60 µl de bionanoconjugados a 12 nM foi considerado ser o volume ideal a aplicar no teste. Estes migraram por capilaridade e estabeleceram ligação com o antígeno imobilizado na linha de teste e com o anticorpo secundário imobilizado na linha de controlo. Uma linha vermelha que demonstra a presença de *PfHRP2* foi visualizada na zona de teste com a imobilização de 2,5 µl de antígeno recombinante a uma concentração de 1,5 mg/mL. O anticorpo secundário foi detetado na linha de controlo em presença de uma diluição de anti-IgG de 1:45 ou 1:90 quer se trate de bionanoconjugados AuNP-MUA-anti-*PfHRP2* ou AuNP-CALNN-anti-*PfHRP2*, formados por ligação covalente ou eletrostática. Uma maior diluição de anticorpo secundário foi obtida na presença de nanopartículas funcionalizadas com CALNN, tornando-se uma mais-valia para o desenvolvimento de um TDR de menor custo.

O estudo realizado pode ser considerado como a base para o desenvolvimento futuro de um TDR usando amostras clínicas, com possibilidade de aplicação em laboratórios clínicos e em análises de campo nos países em vias de desenvolvimento.

Pretende-se dar continuidade a este estudo, aumentando a sensibilidade do teste com o uso de nanopartículas de ouro de maior diâmetro (por exemplo, cerca de 50 nm), uma vez que estas têm uma intensidade de cor que pode ser até 4 vezes superior à intensidade de cor das AuNP de 13 nm de diâmetro, aqui estudadas, permitindo assim uma melhoria na deteção. Com o mesmo objetivo, pretende-se também projetar um TDR composto por uma zona específica para a deposição das amostras clínicas. Esta zona será desenhada anteriormente à zona de deposição dos bionanoconjugados, para que aquando da aplicação da amostra clínica esta migre, se ligue aos bionanoconjugados imobilizados, e seguidamente continue a sua migração ao longo da tira de papel de filtro, passando pela linha de teste e pela linha de controlo.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Mestre Maria Rebelo e ao Professor Thomas Hänscheid (Instituto de Medicina Molecular) pelas culturas de sangue infetadas com *Plasmodium falciparum*.

Ao Professor Daniel E. Goldberg (Universidade de Washington, E.U.A) pelo plasmídeo *PfHRP2* amavelmente cedido.

À Fundação para a Ciência e a Tecnologia (Projeto UID/Multi/04378/2013, UID/CTM/50025/2013 e Bolsa de Pós-Doutoramento SFRH/BPD/63850/2009 (Inês Gomes)), parte do Programa EDCTP2 apoiado pela União Europeia e COMPETE (Portugal) pelo apoio financeiro.

Bibliografia

1. Baptista P, Doria G, Quaresma P, Cavadas M, Neves CS, Gomes I, Eaton P, Pereira E, Franco R (2011). Nanoparticles in Molecular Diagnostics, Progress in Molecular Biology and Translational Science: Nanoparticles in Translational Science and Medicine, volume 104, chapter 11, p. 427-488, Villaverde Antoni, ed., Academic Press Co., Elsevier Publishing Services.
2. World Health Organization, WHO (2014). World Malaria Report, Geneva, Switzerland.
3. Prudêncio M, Rodrigues A, Mota MM (2006). The silent path to thousands of merozoites: the Plasmodium liver stage. *Nat Rev Microbiol* 4(11): 849-856.
4. Arez AP, Rosário VE (2008). The Relevance of molecular markers in the analysis of malaria parasite populations. *Transboundary and Emerging Diseases* 55, 226-232.
5. Bartoloni A, Zammarchi L (2012). Clinical aspects of uncomplicated and severe malaria. *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis* 4(1) e2012026.
6. Moody A (2002). Rapid diagnostic tests for malaria parasites. *Clinical Microbiology Reviews* 15(1) 66-78.
7. Rosenthal PJ (2012). How do we best diagnose malaria in Africa? *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 86(2), 192-193.
8. Wilson ML (2012). Malaria rapid diagnostic tests. *Medical Microbiology* 54, 1637-1641.
9. Murray CK, Bennet JW (2009). Rapid diagnosis of malaria. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.* 1-7.
10. Chodini PL, Bowers K, Jorgensen P, Barnwell JW, Grady KK, Luchavez J, Moody AH, Cenizal A, Bell D (2007). The heat stability of Plasmodium lactate dehydrogenase-based and histidine rich protein 2-based malaria rapid diagnostic tests. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 101(4), 331-337.
11. World Health Organization, WHO (versão 2015). Global Malaria Programme, Information note on recommended selection criteria for procurement of malaria rapid diagnostic tests.
12. Peixoto de Almeida M, Pereira E, Baptista P, Gomes I, Figueiredo S, Soares L, Franco R (2014). Gold Nanoparticles as (Bio)Chemical Sensors, Gold Nanoparticles in Analytical Chemistry, Comprehensive Analytical Chemistry, volume 66, chapter 13, p. 530-562, Valcárcel Miguel and López-Lorente Ángela, ed., Elsevier Publishing Services.
13. Baptista P, Pereira E, Eaton P, Miranda A, Gomes I, Quaresma P, Franco R (2008). Gold nanoparticles for the development of clinical diagnosis methods. *Anal Bioanal Chem* 391, 943-950.
14. Lévy R (2006). Peptide-capped gold nanoparticles: towards artificial proteins. *ChemBioChem* 7, 1141-1145.
15. Sheehan D (2000). Physical Biochemistry: Principles and Applications, John Wiley & Sons, Chichester.
16. Lopez-Lorent AI, Simonet BM, Valcarcel M (2011). Electrophoretic methods for the analysis of nanoparticles. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 30, 58-71.
17. Parak WJ, Pellegrino T, Micheel CM, Gerion D, Williams SC, Alivisatos AP (2003). Conformation of oligonucleotides attached to gold nanocrystals probed by gel electrophoresis. *Nano Letters* 3(1), 33-36.
18. Guirgis BSS, Sá e Cunha C, Gomes I, Cavadas M, Silva I, Doria G, Blatch GL, Baptista PV, Pereira E, Azzazy HME, Mota MM, Prudêncio M, Franco R (2012). Gold nanoparticle-based fluorescence immunoassay for malaria antigen detection. *Anal Bioanal Chem* 402: 1019-1027.
19. Yetisen AK, Muhammad SA, Lowe CR (2013). Paper-based microfluidic point-of-care diagnostic devices 13, 2210-2251
20. Costa MN, Veigas B, Jacob JM, Santos DS, Gomes J, Baptista PV, Martins R, Inácio J, Fortunato E (2014). A low cost, safe, disposable, rapid and self-sustainable paper-based platform for diagnostic testing: lab-on-paper 25(9), 094006, doi:10.1088/0957-4484/25/9/094006
21. Turkevich J, Stevenson PC, Hillier J (1951). A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discuss. Faraday Soc.* 11, 55-75.
22. Kimling J, Maier M, Okenve B, Kotaidis V, Ballot H, Plech A (2006). Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited. *J. Phys. Chem. B* 110, 15700-15707.
23. Haiss W, Thanh NTK, Aveyard J, Ferning DG (2007). Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-Vis spectra. *Anal Chem* 79(11): 4215-4221 doi:10.1021/ac0702084.
24. Ndonwi M, Burlingame OO, Miller AS, Tollefsen DM, Broze GJ, Goldberg DE (2011). Inhibition of antithrombin by Plasmodium falciparum histidine-rich protein II. *Blood* 117(23) 6347-6354.
25. Krohn RI (2001). The colorimetric detection and quantification of total protein. In: Current protocols in cell biology. John Wiley & Sons, Inc. doi:10.1002/0471143030.cba03hs15.
26. Wilson K, Walker J (2010). Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology, 7th Ed. Cambridge University Press.
27. Bartczak D, Kanaras AG (2011). Preparation of peptide-functionalized gold nanoparticles using one Pot EDC/Sulfo-NHS coupling. *Langmuir* 27, 10119-10123.
28. Cortez J, Vorobieva E, Gralheira D, Osório I, Soares L, Vale N, Pereira E, Gomes P, Franco R (2011). Bionanoconjugates of tyrosinase and peptide-derivatised gold nanoparticles for biosensing of phenolic compounds. *J Nanopart Res* 13: 1101-1113.
29. Arruebo M, Valladares M, Fernández-González A (2009). Antibody-conjugated nanoparticles for biomedical applications. *Journal of Nanomaterials* 1-24.
30. Rebelo M, Tempera C, Fernandes JF, Grobusch MP, Hänscheid T (2015). Assessing anti-malarial drug effects *ex vivo* using the haemozoin detection assay. *Malaria Journal* 14:140, 1-9. doi:10.1186/s12936-015-0657-8.