

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**DESENVOLVIMENTO DE UM MAGNETO-IMUNOENSAIO  
MICROFLUÍDICO COM DETECÇÃO ELETROQUÍMICA  
PARA DIAGNÓSTICO DE HANSENÍASE**

**Sthéfane Valle de Almeida\***

Tese apresentada como parte dos requisitos  
para obtenção do título de DOUTORA EM  
CIÊNCIAS, área de concentração:  
QUÍMICA ANALÍTICA.

**Orientador: Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria  
Coorientadora: Profa. Dra. Juliana Ferreira de Moura**

**\* bolsista CAPES**

**São Carlos - SP  
2023**

Valle de Almeida, Sthéfane

Desenvolvimento de um magneto-imunoensaio microfluídico com detecção eletroquímica para diagnóstico de hanseníase / Sthéfane Valle de Almeida -- 2023.  
145f.

Tese de Doutorado - Universidade Federal de São Carlos, campus São Carlos, São Carlos  
Orientador (a): Ronaldo Censi Faria  
Banca Examinadora: Márcio Fernando Bergamini, Elen Julciléia Romão Sartori, Fernando Cruz de Moraes, Lauro Tatsuo Kubota  
Bibliografia

1. Dispositivo eletroquímico. 2. Diagnóstico de hanseníase. 3. Magneto-imunoensaio. I. Valle de Almeida, Sthéfane. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática (SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Ronildo Santos Prado - CRB/8 7325



---

**Folha de Aprovação**

---

Defesa de Tese de Doutorado da candidata Sthéfane Valle de Almeida, realizada em 23/03/2023.

**Comissão Julgadora:**

Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria (UFSCar)

Prof. Dr. Márcio Fernando Bergamini (UFPR)

Profa. Dra. Elen Julciléia Romão Sartori (UEL)

Prof. Dr. Fernando Cruz de Moraes (UFSCar)

Prof. Dr. Lauro Tatsuo Kubota (UNICAMP)

## DEDICATÓRIA

À minha mãe, Leni.  
Você é meu maior tesouro.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, pela força e proteção em toda minha vida.

À minha mãe Leni, por ser minha maior incentivadora desde o início dessa jornada. Se cheguei até aqui hoje e se busco um futuro melhor, é por você. Obrigada pelo apoio e carinho, mesmo de longe e com todos os obstáculos que enfrentamos. Ao meu pai Antonio Carlos, pelo apoio e amor ao longo dos anos, por sempre me incentivar a buscar o melhor e pensar no futuro com esperança.

Aos demais familiares que me deram todo o incentivo desde o início da jornada acadêmica, mesmo de longe.

Ao meu namorado Jonatas, por ter acompanhado toda minha jornada neste período com dedicação, carinho, atenção e apoio. Em especial, agradeço pelos momentos de companhia durante o isolamento social, pois tenho certeza de que se não enlouqueci foi por sua causa.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria, por todos os aprendizados recebidos nesses 4 anos de doutorado que tanto contribuíram para minha formação profissional e pessoal. Esse trabalho foi desenvolvido devido à sua paciência e acolhimento ao me orientar, incentivando a pesquisadora dentro de mim a sempre fazer o meu melhor.

À minha coorientadora, Profa. Dra. Juliana Ferreira de Moura, por me dar o todo o suporte e incentivo quando necessário. A cada uma de nossas reuniões, ressaltava em mim o quanto esta pesquisa é importante, fazendo com que eu acreditasse nela mesmo com as dificuldades encontradas pelo caminho.

Aos membros da banca, pela disponibilidade em participar e contribuir com este trabalho.

À Dra. Tássia Regina de Oliveira e ao Dr. Wilson Thiago da Fonseca pela ajuda nos experimentos e discussões sempre que solicitados.

Aos colegas do Laboratório de Bioanalítica e Eletroanalítica (LABIE), tanto pelos momentos de discussão científica quanto por nossos cafezinhos da tarde. Obrigada especialmente pelos momentos em que as coisas não davam certo e, além do suporte (experimental e emocional), era montada uma verdadeira força-tarefa para encontrar e solucionar o problema. Espero ter contribuído para a formação de vocês como vocês contribuíram para a minha.

À minha amiga de Guarapuava, Juliana, pelo apoio emocional mesmo de longe e por sempre acreditar em mim. Também agradeço às minhas amigas de São Carlos, Karla, Tássia e Taíse, por terem sido o melhor presente que o doutorado me trouxe.

À coordenação e secretaria de Pós-Graduação em Química da UFSCar (PPGQ), sempre dispostos a ajudar quando solicitados.

À Universidade Federal de São Carlos e ao Departamento de Química pela estrutura fornecida para realização deste trabalho.

A todos os órgãos de fomento, em especial a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela bolsa concedida. (O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001).

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|              |  |
|--------------|--|
| $\Delta f$   | Variação de frequência   |
| <b>1-NP</b>  | 1-naftol   |
| <b>1-NPP</b> | 1-naftil fosfato   |
| <b>A</b>     | Ampére   |
| <b>Abs</b>   | Absorbância  |
| <b>Ac</b>    | Anticorpo  |
| <b>ACE-2</b> | Enzima conversora da angiotensina 2 (do inglês <i>Angiotensin converting enzyme 2</i> )  |
| <b>Ag85</b>  | Antígeno85   |
| <b>ALP</b>   | Fosfatase alcalina (do inglês <i>alkaline phosphatase</i> )                              |
| <b>ANOVA</b> | Análise de variância   |
| <b>AUC</b>   | Área sob a curva ROC (do inglês <i>Area under the curve</i> )                            |
| <b>AuNPs</b> | Nanopartículas de ouro   |
| <b>BQ</b>    | p-benzoquinona   |
| <b>C</b>     | Concentração   |
| <b>CFP10</b> | Proteína de filtrado de cultura 10   |
| <b>D</b>     | Desejabilidade   |
| <b>Da</b>    | Dalton   |
| $D_{eq}$     | Diâmetro equivalente   |
| <b>DMSO</b>  | Dimetilsulfóxido   |
| <b>DP</b>    | Desvio padrão  |
| <b>DPR</b>   | Desvio padrão relativo   |
| <b>EDC</b>   | 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida  |
| <b>ELISA</b> | Ensaio de imunoabsorção enzimática (do inglês <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> ) |
| $E_p$        | Potencial de pico  |
| $E_{pOx}$    | Potencial de pico de oxidação  |
| $E_{pRed}$   | Potencial de pico de redução   |

|  |  |
|--|--|
| <b>ESAT6</b>                               | Proteína alvo antigênica secretora precoce 6   |
| <b>Et-NH<sub>2</sub></b>                   | Etanolamina  |
| <b><i>f</i></b>                            | Frequência ressonante  |
| <b>FMA</b>                                 | Ácido ferroceno monocarboxílico  |
| <b>g</b>                                   | Gramma   |
| <b>HQ</b>                                  | Hidroquinona   |
| <b>HRP</b>                                 | Enzima <i>horseradish peroxidase</i>   |
| <b>Hz</b>                                  | Hertz  |
| <b>I</b>                                   | Corrente   |
| <b>INMETRO</b>                             | Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia   |
| <b><i>I<sub>p</sub></i></b>                | Corrente de pico   |
| <b><i>I<sub>pOx</sub></i></b>              | Corrente de pico de oxidação   |
| <b><i>I<sub>pRed</sub></i></b>             | Corrente de pico de redução  |
| <b>L</b>                                   | Litro  |
| <b>LFA</b>                                 | Ensaio de fluxo lateral (do inglês, LFA – <i>Lateral flow assay</i> )  |
| <b>m</b>                                   | Massa  |
| <b>MB</b>                                  | Multibacilares   |
| <b>MES</b>                                 | Ácido 2-N-morfolinoetanossulfônico   |
| <b>MHO</b>                                 | 6-mercapto-1-hexanol   |
| <b>mol</b>                                 | Unidade de quantidade de matéria   |
| <b><i>MS<sub>EP</sub></i></b>              | Média quadrática do erro puro  |
| <b><i>MS<sub>falta de ajuste</sub></i></b> | Média quadrática de falta de ajuste  |
| <b><i>MS<sub>reg</sub></i></b>             | Médias quadráticas de regressão  |
| <b><i>MS<sub>res</sub></i></b>             | Médias quadráticas dos resíduos  |
| <b>MUA</b>                                 | Ácido 11-mercaptoundecanóico   |
| <b>NATA</b>                                | Associação Nacional de Autoridades de Teste da Austrália (do inglês <i>National Association of Testing Authorities</i> ) |
| <b>NHS</b>                                 | N-hidroxisuccinimida   |
| <b>OMS</b>                                 | Organização Mundial da Saúde   |



|                      |  |
|----------------------|--|
| <b>PB</b>            | Paucibacilares   |
| <b>PBS</b>           | Tampão fosfato salino (do inglês <i>Phosphate buffer saline</i> )                                      |
| <b>PCR</b>           | Reação de cadeia em polimerase (do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i> )                           |
| <b>PDMS</b>          | Polímero dimetil polissiloxano   |
| <b>pep</b>           | Peptídeo   |
| <b>PETG</b>          | Poliétileno tereftalato modificado com glicol  |
| <b>PGL-I</b>         | Glicolípídeo fenólico-1  |
| <b>pH</b>            | Potencial hidrogeniônico   |
| <b>PM</b>            | Partículas magnéticas  |
| <b>POCT</b>          | Teste no ponto de atendimento (do inglês, <i>Point of care testing</i> )                               |
| <b>PQT-U</b>         | Poliquimioterapia única  |
| <b>PSA</b>           | Antígeno prostático específico   |
| <b>QCM</b>           | Microbalança de cristal de quartzo (do inglês <i>Quartz crystal microbalance</i> )                     |
| <b>qPCR</b>          | Reação de cadeia em polimerase quantitativa (do inglês <i>Quantitative polymerase chain reaction</i> ) |
| <b>r</b>             | Coefficiente de correlação   |
| <b>R<sup>2</sup></b> | Coefficiente de determinação   |
| <b>ROC</b>           | Característica de Operação do Receptor (do inglês <i>Receiver Operating Characteristic Curve</i> )     |
| <b>SPCE</b>          | Eletrodos de carbono serigrafados (do inglês <i>Screen-printed carbono electrodes</i> )                |
| <b>SPE</b>           | Eletrodos serigrafados (do inglês <i>Screen-printed electrodes</i> )                                   |
| <b>SQEP</b>          | Soma quadrática do erro puro   |
| <b>SUS</b>           | Sistema Único de Saúde   |
| <b>Tris-HCl</b>      | Tris(hidroximetil)aminometano-hidrocloreto   |
| <b>UV-Vis</b>        | Ultravioleta-Visível   |

|            |                         |
|------------|-------------------------|
| $\nu$      | Velocidade de varredura |
| $V$        | Volume                  |
| $VC$       | Voltametria cíclica     |
| $\Delta F$ | Relação amostra-branco  |
| $\lambda$  | Comprimento de onda     |
| $\rho$     | Densidade               |

## LISTA DE TABELAS

|  |     |
|--|-----|
| TABELA 3.1 - Variáveis reais avaliadas no estudo de robustez.....  | 39  |
| TABELA 3.2 - Matriz do planejamento experimental saturado de Plackett-Burman para avaliação da robustez dos eletrodos descartáveis e resposta voltamétrica obtida.....                             | 44  |
| TABELA 3.3 - Valores de obtidos no estudo de estabilidade ao longo de 70 dias .....  | 47  |
| TABELA 3.4 - Valores de obtidos no estudo de estabilidade ao longo de 23 semanas .....   | 49  |
| TABELA 4.1 - Planejamento fatorial para otimização das partículas magnéticas .....   | 63  |
| TABELA 4.2 - Planejamento fatorial para otimização das partículas magnéticas e resposta de $\Delta F$ (%) obtida.....  | 68  |
| TABELA 4.3 - Resultados da análise de regressão linear no intervalo de 95% de confiança .....  | 72  |
| TABELA 4.4 - Análise da significância estatística das diferenças de resposta entre diferentes grupos individualmente.....  | 78  |
| TABELA 5.1 - Planejamento fatorial para otimização do imunoenensaio .....  | 88  |
| TABELA 5.2 - Planejamento fatorial composto central para múltiplas respostas para otimização das condições experimentais, respostas $\Delta F$ (%) obtidas e desejabilidade ( $D$ ) calculada..... | 92  |
| TABELA 5.3 - Matriz de condição.....   | 92  |
| TABELA 5.4 - Valores previstos, valores experimentais e erro relativo referente às condições utilizadas .....  | 96  |
| TABELA 5.5 - Análise da significância estatística das diferenças de resposta entre diferentes grupos individualmente.....  | 103 |

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| FIGURA 1.1 - Diferentes aspectos das lesões de pele causadas pela hanseníase.   | 3  |
| FIGURA 1.2 - Fotomicrografia de (A) bacilos isolados e (B) globias da <i>M. leprae</i> .  | 7  |
| FIGURA 1.3 - Fluxograma de diagnóstico de hanseníase para indivíduos não contactantes com sintomas.   | 8  |
| FIGURA 1.4 - Fluxograma de diagnóstico de hanseníase para contatos de caso de hanseníase confirmado.  | 11 |
| FIGURA 1.5 - Estrutura de um anticorpo. Em azul as cadeias leves e em verde as cadeias pesadas, ligadas por pontes dissulfeto (-S-S-).  | 14 |
| FIGURA 1.6 - Formação do complexo imune.  | 15 |
| FIGURA 1.7 - Eletrodos serigrafados de diferentes <i>layouts</i> .  | 26 |
| FIGURA 3.1 - Fabricação dos arranjos de eletrodos de trabalho, referência e contra-eletrodo.  | 38 |
| FIGURA 3.2 - (A) Esquema da célula eletroquímica simples utilizado neste estudo, com seus componentes. (B) Foto real da célula.   | 40 |
| FIGURA 3.3 - (A) Imobilização do peptídeo na superfície do cristal de quartzo. (B) Célula microfluídica (150 $\mu$ L) utilizada para acoplar o cristal à QCM e à bomba. (C) Adição e lavagem da amostra à célula microfluídica.   | 43 |
| FIGURA 3.4 - (A) Voltamogramas cíclicos para os experimentos realizados no planejamento experimental. (B) Gráfico de probabilidade no intervalo de (A) -0,4 a 0,4 $\mu$ A, gerado no <i>software</i> Octave.  | 45 |
| FIGURA 3.5 - Resultados do estudo de estabilidade ao longo de 70 dias após fabricação dos eletrodos. (A) Valores de $I_{pOx}$ . (B) Valores de $I_{pRed}$ . (C) Valores de $E_{pOx}$ . (D) Valores de $E_{pRed}$ .  | 46 |
| FIGURA 3.6 - Resultados do estudo de estabilidade ao longo de 23 semanas após fabricação dos eletrodos. (A) Valores de $I_{pOx}$ . (B) Valores de $I_{pRed}$ . (C) Valores de $E_{pOx}$ . (D) Valores de $E_{pRed}$ .   | 48 |
| FIGURA 3.7 - Estudo da reatividade dos peptídeos frente à amostra de soro (●) saudável e (●) hanseniana (MB). (A) Frequência ressonante em função do tempo e (B) gráfico de barras para a variação de frequência ( $-\Delta f$ ) obtidos para o peptídeo APDDPAWQNIFNLRR. (C) Frequência ressonante em função do tempo e (D) gráfico de barras para a variação de frequência ( $-\Delta f$ ) obtidos para o peptídeo SGLSQVTGLFGVPGL. | 51 |
| FIGURA 3.8 - Estudo da reatividade do peptídeo ${}_{24}\text{QAKTFLDKFNHEAEDLFYQ}_{42}\text{C}$ (controle negativo) frente à amostra de soro (●) saudável e (●) hanseniana (MB). (A) Frequência ressonante em função do tempo e (B) gráfico de barras para a variação de frequência ( $-\Delta f$ ).  | 52 |

- FIGURA 4.1 - (A) Esquema do dispositivo microfluídico utilizado neste estudo, com seus componentes: 1) orifícios para entrada e 2) para saída de solução; 3) eletrodo auxiliar; 4) arranjo de eletrodos de trabalho (8 eletrodos); e 5) eletrodo de referência (Ag/AgCl voltado para dentro do canal microfluídico). (B) Foto real do dispositivo pronto para uso. .... 58
- FIGURA 4.2 - Sistema microfluídico e seus componentes: (1) bomba de seringa; (2) válvula injetora; (3) dispositivo microfluídico descartável; (4) multipotenciostato; (5) computador pessoal; (6) resultado de corrente transiente gerado. .... 59
- FIGURA 4.3 - Ciclo catalítico da enzima HRP. .... 60
- FIGURA 4.4 - Ativação das PMs com EDC/NHS e adição de peptídeo às PMs, formando o conjugado pep/PM; Bloqueio dos sítios não específicos de ligação com etanolamina..... 61
- FIGURA 4.5 - Adição de pep/PM à amostra contendo anticorpos anti *M. leprae*; Separação magnética do bioconjugado Ac/pep/PM para lavagem e eliminação dos demais interferentes da amostra; Adição de HRP/IgG; Separação magnética do bioconjugado HRP/IgG/Ac/pep/PM para lavagem e eliminação de partículas em excesso. .... 62
- FIGURA 4.6 - (A) Espectros de absorção UV-Vis em diferentes concentrações do peptídeo: (●) 0,069; (●) 0,14; (●) 0,27; (●) 0,55; (●) 2,76  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Inserido: espectro de absorção UV-Vis da lavagem. (B) Curva analítica do peptídeo obtida por UV-Vis..... 66
- FIGURA 4.7 - (A) Gráfico de contorno (valores de  $\Delta F$  (%) inseridos em branco) e (B) gráfico de superfície de resposta (valores de  $\Delta F$  (%) inseridos abaixo) para diferentes concentrações de peptídeo e volumes de pep/PM..... 70
- FIGURA 4.8 - (A) Sinais de corrente transiente para diferentes diluições da amostra de soro humano: (●) 1:400; (●) 1:350; (●) 1:250; (●) 1:100; (●) 1:50; (●) branco (soro de bezerro) em cada diluição. (B) Correlação entre diluição da amostra e  $\Delta F$  (%), calculado a partir da resposta de corrente transiente obtida. .... 71
- FIGURA 4.9 - Gráfico de barras referente ao estudo de precisão (A) intradias (mesmo dia, dispositivos diferentes); (B) interdias (dias diferentes); (C) 5 eletrodos de um mesmo dispositivo..... 73
- FIGURA 4.10 - (A) Sinal de corrente transiente e (B) gráfico de corrente resultante dos eletrodos de um mesmo arranjo para amostras: (●) soro fetal bovino (branco); (●) indivíduo saudável; (●) PB; (●) MB..... 74
- FIGURA 4.11 - Diagrama de caixas para os valores de  $\Delta F$  (%) encontrados para indivíduos (●) saudáveis; (●) pacientes PB; e (●) pacientes MB. ( $p < 0,05$ ). .... 75
- FIGURA 4.12 - Curva ROC para diagnóstico de hanseníase. Resposta de indivíduos saudáveis vs pacientes hansenianos PB + MB..... 76

- FIGURA 4.13 - Diagrama de pontos para diferentes níveis de hanseníase, avaliados independentemente. (A) saudável (não hansenianos) vs PB; (B) saudável (não hansenianos) vs MB; (C) PB vs MB..... 77
- FIGURA 5.1 - Adição de pep/PM à amostra contendo anticorpos anti *M. leprae*; Separação magnética do bioconjugado Ac/pep/PM para lavagem e eliminação dos demais interferentes da amostra; Adição de ALP/IgG; Separação magnética do bioconjugado ALP/IgG/Ac/pep/PM para lavagem e eliminação de partículas em excesso. .... 84
- FIGURA 5.2 - A) Esquema do teclado de injeção utilizado neste estudo, com seus componentes: 1) 8 teclas (vermelho), 2) base do teclado e 3) dispositivo microfluídico posicionado. (B) Foto real do teclado de injeção pronto para uso. .... 85
- FIGURA 5.3 - Esquema da injeção do bioconjugado utilizando o teclado de injeção. O dispositivo microfluídico é acoplado à 1) válvula injetora e à bomba de seringa, e posicionado sobre o 2) teclado de injeção. 3) O bioconjugado é adicionado e percorre o canal microfluídico até chegar ao ímã, posicionado abaixo do eletrodo ao abaixar a última tecla. .... 86
- FIGURA 5.4 - Hidrólise do 1-NPP catalisada pela enzima ALP. .... 87
- FIGURA 5.5 - (A) Sinal de corrente transiente e (B) gráfico de corrente resultante dos eletrodos de um mesmo arranjo. Adicionou-se sobre os eletrodos o bioconjugado utilizando (●) teclado de injeção e (●) pipeta automática. .... 90
- FIGURA 5.6 - Gráfico de contorno referentes à desejabilidade para diferentes concentrações de IgG/ALP e 1-NPP, com condições ótimas indicadas..... 94
- FIGURA 5.7 - (A) Sinais de corrente transiente para: a (●) 1-NPP = 0,32 mmol L<sup>-1</sup> e IgG/ALP = 3,68 µg mL<sup>-1</sup>; b (●) 1-NPP = 0,32 mmol L<sup>-1</sup> e IgG/ALP = 0,32 µg mL<sup>-1</sup>; c (●) 1-NPP = 1,00 mmol L<sup>-1</sup> e IgG/ALP = 3,00 µg mL<sup>-1</sup>. (B) Gráfico de contorno referentes à desejabilidade para diferentes concentrações de IgG/ALP e 1-NPP, com condição escolhida indicada. .... 95
- FIGURA 5.8 - (A) Sinais de corrente transiente para diferentes diluições da amostra de soro humano: (●) 1:400; (●) 1:350; (●) 1:250; (●) 1:100; (●) 1:50; (●) branco (soro de bezerro) em cada diluição. (B) Diluição da amostra vs  $\Delta F(\%)$ , calculado a partir da resposta de corrente transiente obtida. .... 97
- FIGURA 5.9 - Gráfico de barras referente ao estudo de precisão (A) intradias (mesmo dia, dispositivos diferentes); (B) interdias (dias diferentes); (C) 7 eletrodos de um mesmo dispositivo..... 98
- FIGURA 5.10 - (A) Sinal de corrente transiente e (B) gráfico de corrente resultante dos eletrodos de um mesmo arranjo para amostras: (●) soro fetal bovino (branco); (●) indivíduo saudável; (●) PB; (●) MB..... 99

- FIGURA 5.11 - Diagrama de caixas para os valores de  $\Delta F(\%)$  encontrados para indivíduos (●) saudáveis; (●) pacientes PB; e (●) pacientes MB. ( $p < 0,05$ ).  
..... 100
- FIGURA 5.12 - Curva ROC para diagnóstico de hanseníase. Resposta de indivíduos saudável vs pacientes hansenianos PB + MB. .... 101
- FIGURA 5.13 – Diagrama de pontos para diferentes níveis de hanseníase, avaliados independentemente. (A) saudável (não hansenianos) vs PB; (B) saudável (não hansenianos) vs MB; (C) PB vs MB..... 102

## RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE UM MAGNETO-IMUNOENSAIO MICROFLUÍDICO COM DETECÇÃO ELETROQUÍMICA PARA DIAGNÓSTICO DE HANSENÍASE. A hanseníase é uma doença infecciosa causada pela bactéria *Mycobacterium leprae* e seu diagnóstico é realizado majoritariamente por exame clínico. Assim, neste trabalho foram desenvolvidos dois magneto-imunoensaios para diagnóstico sorológico de hanseníase utilizando amperometria e um dispositivo microfluídico descartável. Os eletrodos produzidos se mostraram precisos, robustos e estáveis por até 70 dias após serigrafados. Os peptídeos foram conjugados à superfície de partículas magnéticas (pep/PM), sendo adicionado à amostra de soro para captura dos anticorpos anti-*M. leprae*. O primeiro imunoensaio utilizou uma sequência peptídica derivada da proteína 85B. O bioconjugado final foi adicionado ao eletrodo manualmente, utilizando uma micropipeta. A detecção eletroquímica utilizou *horseradish peroxidase* (HRP) com solução de detecção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e hidroquinona (HQ). O segundo imunoensaio utilizou uma sequência peptídica derivada da proteína recombinante ML0405. O bioconjugado final foi adicionado ao eletrodo usando um teclado de injeção. A detecção foi realizada com fosfatase alcalina (ALP) e solução de detecção de 1-naftil-fosfato (1-NPP). A precisão foi avaliada pelas respostas obtidas em diferentes eletrodos do mesmo dispositivo, em diferentes dispositivos e em diferentes dias de análise, obtendo-se valores de desvio padrão relativo (DPR%) entre 4,8% e 13,6%. Foram realizadas análises de amostras saudáveis, paucibacilares (PB) e multibacilares (MB). Ambos os imunoensaios apresentaram excelente seletividade e especificidade para identificar os pacientes positivos, inclusive os PB. O primeiro ensaio distinguiu os pacientes PB dos MB, o que o torna aplicável também à classificação da doença. Os magneto-imunoensaios apresentaram uma excelente capacidade discriminatória entre pacientes positivos e negativos, sendo capazes até mesmo de identificar pacientes PB com alta sensibilidade, especificidade e precisão. Assim, apresentam potencial para orientar o tratamento adequado, melhorando a qualidade de vida dos pacientes.

**Palavras-chave:** Magneto-imunoensaio. Hanseníase. Peptídeo sintético. Diagnóstico sorológico.



**ABSTRACT**

DEVELOPMENT OF A MICROFLUIDIC MAGNETO-IMMUNOASSAY WITH ELECTROCHEMICAL DETECTION FOR THE DIAGNOSIS OF LEPROSY. Leprosy is an infectious disease caused by the bacteria *Mycobacterium leprae* and its diagnosis is mostly performed by clinical examination. Thus, in this work, two magnetoimmunoassays were developed for the serological diagnosis of leprosy using amperometry and a disposable microfluidic device. The electrodes produced proved to be accurate, robust and stable for up to 70 days after screen printing. The peptides were conjugated to the surface of magnetic particles (pep/MP), being added to the serum sample to capture the anti-*M. leprae*. The first immunoassay used a peptide sequence derived from the 85B protein. The final bioconjugate was added to the electrode manually using a micropipette. Electrochemical detection used *horseradish peroxidase* (HRP) with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and hydroquinone (HQ) detection solution. The second immunoassay used a peptide sequence derived from the recombinant protein ML0405. The final bioconjugate was added to the electrode using an injection pad. Detection was performed with alkaline phosphatase (ALP) and 1-naphthyl-phosphate (1-NPP) detection solution. Precision was evaluated by the responses obtained in different electrodes of the same device, in different devices and on different days of analysis, obtaining values of relative standard deviation (RSD%) between 4.8% and 13.6%. Analyzes of healthy, paucibacillary (PB) and multibacillary (MB) samples were performed. Both immunoassays showed excellent selectivity and specificity to identify positive patients, including PB. The first trial distinguished PB from MB patients, which makes it also applicable to disease classification. The magneto-immunoassays showed an excellent discriminatory capacity between positive and negative patients, being able to even identify PB patients with high sensitivity, specificity and precision. Thus, they have the potential to guide the appropriate treatment, improving the quality of life of patients.

**Keywords:** Magneto-immunoassay. Leprosy. Synthetic peptide. Serological diagnosis.

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| <b>1 - INTRODUÇÃO</b> .....  | 2  |
| <b>1.1 - Hanseníase</b> .....  | 2  |
| <b>1.2 - Diagnóstico de hanseníase</b> .....                                       | 5  |
| 1.2.1 – <i>Indivíduo não contactante</i> .....                                     | 5  |
| 1.2.2 – <i>Indivíduo contactante</i> .....   | 8  |
| 1.2.3 – <i>Diagnóstico de hanseníase na literatura</i> .....                       | 12 |
| <b>1.3 – Imunoensaios e imunossensores</b> .....                                   | 13 |
| 1.3.1 – <i>Imunoensaios para diagnóstico de hanseníase</i> .....                   | 17 |
| <b>1.4 – Peptídeos sintéticos</b> .....  | 18 |
| 1.4.1 – <i>Antígeno 85B (Ag85B)</i> .....  | 19 |
| 1.4.2 – <i>Antígeno ML0405</i> .....   | 20 |
| <b>1.5 – Partículas magnéticas em imunoensaios</b> .....                           | 21 |
| <b>1.6 – Dispositivos eletroquímicos descartáveis para análises clínicas</b> ..... | 23 |
| 1.6.1 – <i>Eletrodos serigrafados</i> .....  | 24 |
| <b>1.7 – Sistema microfluídico</b> .....   | 26 |
| <b>2 - JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS</b> .....   | 30 |
| <b>2.1 – Justificativa</b> .....   | 30 |
| <b>2.2 – Objetivo Geral</b> .....  | 30 |
| <b>2.3 – Objetivos Específicos</b> .....   | 31 |
| <b>3 - AVALIAÇÃO DOS SPCEs E DA REATIVIDADE DOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS</b> .....     | 34 |
| <b>3.1 – Procedimento experimental</b> .....                                       | 34 |
| 3.1.1 – <i>Reagentes e soluções</i> .....  | 34 |
| 3.1.2 – <i>Instrumentação e materiais</i> .....                                    | 35 |
| 3.1.3 – <i>Peptídeos sintéticos</i> .....  | 35 |
| 3.1.4 – <i>Amostras de soro</i> .....  | 36 |
| 3.1.5 – <i>Eletrodos serigrafados impressos de carbono (SPCE)</i> .....            | 37 |
| 3.1.5.1 – <i>Estudo da robustez dos SPCEs</i> .....                                | 38 |
| 3.1.5.2 – <i>Estudo da estabilidade dos SPCEs</i> .....                            | 40 |
| 3.1.6 – <i>Avaliação da reatividade dos peptídeos</i> .....                        | 41 |
| <b>3.2 – Resultados e discussão</b> .....  | 43 |

|   |           |
|---|-----------|
| 3.2.1 – Estudo da robustez dos SPCEs .....  | 43        |
| 3.2.2 – Estudo da estabilidade dos SPCEs .....  | 45        |
| 3.2.2.1 – Estabilidade em 70 dias .....   | 45        |
| 3.2.2.2 – Estabilidade em 23 semanas .....  | 47        |
| 3.2.3 – Avaliação da reatividade dos peptídeos .....  | 49        |
| <b>3.3 – Considerações parciais .....</b>   | <b>52</b> |
| <b>4 - DESENVOLVIMENTO DE IMUNOENSAIO PARA DETECÇÃO<br/>DE ANTI-M. LEPRAE UTILIZANDO O PEPTÍDEO<br/>APDDPAWQNIFNLRR .....</b> | <b>56</b> |
| <b>4.1 – Procedimento experimental .....</b>  | <b>56</b> |
| 4.1.1 – Reagentes e soluções.....   | 56        |
| 4.1.2 – Instrumentação e materiais .....  | 56        |
| 4.1.3 – Montagem do dispositivo microfluídico descartável.....  | 57        |
| 4.1.4 – Sistema microfluídico com detecção eletroquímica .....  | 58        |
| 4.1.5 – Ancoragem do peptídeo à PM .....  | 60        |
| 4.1.6 – Eficiência da ancoragem do peptídeo à PM.....   | 61        |
| 4.1.7 – Captura de anti-M. leprae em amostras de soro.....  | 61        |
| 4.1.8 – Otimização do conjugado pep/PM no ensaio .....  | 62        |
| 4.1.9 – Curva de diluição da amostra .....  | 64        |
| 4.1.10 – Precisão do imunoensaio .....  | 64        |
| 4.1.11 – Desempenho do imunoensaio para diagnóstico sorológico de<br>hanseníase .....   | 65        |
| <b>4.2 – Resultados e discussão .....</b>   | <b>66</b> |
| 4.2.1 – Eficiência da ancoragem do peptídeo à PM.....   | 66        |
| 4.2.2 – Otimização do conjugado pep/PM no ensaio .....  | 67        |
| 4.2.3 – Curva de diluição da amostra .....  | 70        |
| 4.2.4 – Precisão do imunoensaio .....   | 72        |
| 4.2.5 – Desempenho do imunoensaio para diagnóstico sorológico de<br>hanseníase .....  | 73        |
| <b>4.3 – Considerações parciais .....</b>   | <b>78</b> |
| <b>5 - DESENVOLVIMENTO DE IMUNOENSAIO PARA DETECÇÃO<br/>DE ANTI-M. LEPRAE UTILIZANDO O PEPTÍDEO<br/>SGLSQVTGLFGVPGL .....</b> | <b>82</b> |

|   |     |
|---|-----|
| <b>5.1 – Procedimento experimental</b> .....  | 82  |
| 5.1.1 – Reagentes e soluções.....   | 82  |
| 5.1.2 – Instrumentação e materiais .....  | 82  |
| 5.1.3 – Ancoragem do peptídeo à PM .....  | 83  |
| 5.1.4 – Captura de anti- <i>M. leprae</i> em amostras de soro.....                            | 83  |
| 5.1.5 – Adição do bioconjugado à superfície eletródica.....                                   | 84  |
| 5.1.6 – Sistema microfluídico com detecção eletroquímica .....                                | 86  |
| 5.1.7 – Otimização das condições experimentais .....  | 87  |
| 5.1.8 – Precisão do imunoenensaio.....  | 89  |
| 5.1.9 – Desempenho do imunoenensaio para diagnóstico sorológico de<br><i>hanseníase</i> ..... | 89  |
| <b>5.2 – Resultados e discussão</b> .....   | 90  |
| 5.2.1 – Eficiência do teclado de injeção .....  | 90  |
| 5.2.2 – Otimização das condições experimentais .....  | 91  |
| 5.2.2.1 – Ajuste do modelo do planejamento experimental.....                                  | 91  |
| 5.2.2.2 – Otimização das concentrações de IgG/ALP e 1-NPP .....                               | 94  |
| 5.2.2.3 – Curva de diluição da amostra .....  | 96  |
| 5.2.3 – Precisão do imunoenensaio.....  | 97  |
| 5.2.4 – Desempenho do imunoenensaio para diagnóstico sorológico de<br><i>hanseníase</i> ..... | 99  |
| <b>5.3 – Considerações parciais</b> .....   | 103 |
| <b>6 - CONCLUSÕES</b> .....   | 106 |
| <b>REFERÊNCIAS</b> .....  | 109 |

# ***INTRODUÇÃO***

## ***Capítulo 1***

# 1 - INTRODUÇÃO

## 1.1 - Hanseníase

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica causada pela bactéria *Mycobacterium leprae*, podendo acometer humanos e outros animais como tatus, esquilos e primatas (chimpanzé, macaco-rhesus, macaco-prego)<sup>1-3</sup>. É considerada uma doença tropical negligenciada pela Organização Mundial de Saúde (OMS), afetando predominantemente pessoas em situação de vulnerabilidade<sup>4,5</sup>. Embora não seja considerada uma doença fatal, quando não tratada corretamente pode levar a danos irreversíveis ao sistema nervoso, comprometendo a qualidade de vida do paciente<sup>6</sup>.

A hanseníase é uma das doenças mais antigas registradas, com evidências que datam de 4.000 a.C. na China, Egito e Índia<sup>7,8</sup>. Nos séculos IV e V foi registrada a fundação dos primeiros leprosários, também conhecidos como hospitais-colônia ou asilos-colônia, visando isolar pacientes com a doença para evitar sua disseminação<sup>9</sup>. Nas Américas, estudos indicam que os primeiros casos de hanseníase ocorreram entre os séculos XVI e XVII, durante o período de colonização<sup>10</sup>. Entretanto, no Brasil, a hanseníase começou a ser discutida pela comunidade médica apenas no final do século XIX e início do XX, aprovando-se moções de profilaxia que envolviam o isolamento total do paciente em colônias onde poderiam trabalhar e receber o tratamento<sup>11</sup>.

A *M. leprae* é um bacilo álcool-ácido resistente e fracamente gram-positivo na forma de bastonete. É um parasita intracelular obrigatório das células de Schwann e dos macrófagos. A transmissão da *M. leprae* ocorre pelo contato com pessoas contaminadas por meio de gotículas que adentram o organismo pela mucosa nasal. Entretanto, seu tempo de incubação é longo (2 – 10 anos, em média), de modo que exige um contato prolongado com uma pessoa infectada para que ocorra a transmissão da doença<sup>12,13</sup>. Devido a isto e a ser uma bactéria não formadora de esporo, a *M. leprae* não pode ser cultivada *in vitro*, sendo assim atualmente é impossível a produção de uma vacina contra hanseníase<sup>14</sup>.

Ela afeta principalmente os troncos nervosos periféricos e os nervos superficiais da pele, com sintomas que variam conforme a resposta imune do paciente e o grau de endemidade em que ele se encontra<sup>15</sup>. Comumente, pacientes com hanseníase apresentam manchas na pele e lesões nos nervos periféricos (FIGURA 1.1), muitas vezes acompanhados de severos danos sensoriais e motores. Ademais, pode afetar também os olhos e órgãos internos como fígado, mucosas, baço, ossos e testículos<sup>15,16</sup>.



FIGURA 1.1 - Diferentes aspectos das lesões de pele causadas pela hanseníase.

Fonte: Barbieri, R.R. *et. al*<sup>17</sup>.

Segundo a OMS, a hanseníase é considerada um problema de saúde pública. Os países com maior número de novos casos em 2020 são Índia (65.147 casos), Brasil (17.979 casos) e Indonésia (11.173 casos), que correspondem a cerca de 74% dos diagnósticos em um total de 127 países<sup>18,19</sup>. Ressalta-se que o número de novos casos registrados tem sido menor a partir de 2020, provavelmente devido à pandemia de COVID-19. No Brasil, foram detectados 155.359 novos casos entre os anos de 2016 e 2020, sendo 55,5% do sexo masculino. Os estados com maior taxa média de diagnósticos positivos são Mato Grosso e Tocantins, que reportaram respectivamente 71,44 e 53,95 casos a cada 100 mil habitantes, enquanto Rio Grande do Sul e Santa Catarina são consideradas regiões de baixa endemidade. Além disso, a maioria dos pacientes são pessoas

pardas (58,9%) e com ensino fundamental incompleto (40,9%), podendo ser de 5 a 8 vezes mais incidente em população com baixa qualidade de vida<sup>20-22</sup>.

A doença pode ser curada com um tratamento envolvendo a associação dos fármacos rifampicina, dapsona e clofazimina, denominada Poliquimioterapia Única (PQT-U). No Brasil, este tratamento é ofertado gratuitamente pelo Sistema Único de Saúde (SUS) e cerca 80% dos pacientes o completam<sup>18</sup>. O tempo de medicação, que pode variar de 6 a 18 meses, e é determinado de acordo com o caso clínico<sup>15</sup>.

Para facilitar a orientação do tratamento, a OMS recomendou a separação de casos de hanseníase em paucibacilares (PB) e multibacilares (MB), conforme o número de lesões cutâneas e o resultado da baciloscopia<sup>12</sup>. Assim, os casos PB englobam os pacientes que apresentam baciloscopia negativa e cinco ou menos lesões cutâneas, com resposta imunológica prioritariamente celular (mediada por células). Esses casos geralmente são de difícil detecção por métodos sorológicos, uma vez que há baixa produção de anticorpos. Além disso, estudos indicam que pacientes PB apresentam menor período de incubação da doença, manifestando os primeiros sintomas entre 2 e 5 anos após a infecção<sup>13</sup>. Nos casos MB, os pacientes apresentam baciloscopia positiva e mais de cinco lesões cutâneas. Devido à imunidade majoritariamente humoral (mediada por anticorpos), esses casos apresentam títulos detectáveis de anticorpos, sendo relativamente mais fáceis de identificar<sup>16,23</sup>. O surgimento dos sintomas em pacientes MB geralmente leva de 5 a 10 anos, mas a doença pode demorar mais tempo para se manifestar<sup>13</sup>.

O estigma social e a discriminação ainda são obstáculos para a eficiência das políticas públicas relacionadas ao controle da doença, afetando negativamente as relações interpessoais e a saúde mental do paciente<sup>24,25</sup>. Neste sentido, o Brasil se destaca por ser o único país cujo terminologia foi alterada através da Lei nº 9.010/95<sup>26</sup>, oficializando o uso do termo *hanseníase* em substituição à *lepra*. Esta mudança foi considerada positiva pelas pessoas



acometidas pela doença, tornando sua condição não relacionada com termos pejorativos<sup>27,28</sup>. Ademais, os princípios básicos para o controle da hanseníase são a detecção precoce e, conseqüentemente, o tratamento imediato da doença, de modo a quebrar a cadeia de transmissão e minimizar suas sequelas.

## **1.2 - Diagnóstico de hanseníase**

### *1.2.1 – Indivíduo não contactante*

Atualmente, o diagnóstico de hanseníase no Brasil é realizado majoritariamente por meio do exame clínico. Neste exame, o profissional de saúde avalia a presença de manchas na pele que apresentam perda de sensibilidade, falta de sudorese e diminuição de pelos, bem como espessamento do nervo periférico com alterações sensitivas ou motoras. Além disso, pode-se observar a presença de nódulos assintomáticos e, em casos mais graves, dormência nos membros. A Classificação de Madri (1953) é utilizada no Brasil<sup>15,29</sup> visando facilitar o diagnóstico clínico com base nos sintomas<sup>1,15,30,31</sup>. Com essa classificação, é possível que a frequência e duração das doses poliquimioterápicas sejam definidas, aplicando o tratamento adequado o mais rápido possível e evitando a transmissão da doença. Deste modo, a hanseníase pode ser dividida em:

(A) *Indeterminada (PB)*: baciloscopia negativa, com mancha na pele mais clara que ao redor, sem alteração de relevo, com bordas mal delimitadas e sem sudorese. Há perda de sensibilidade térmica e dolorosa, mas não tátil. Fase inicial da doença, que pode evoluir para outra fase ou para a cura.

(B) *Tuberculóide (PB)*: baciloscopia negativa, com mancha elevada na pele, com bordas bem delimitadas e centro claro. Há perda total de sensibilidade. Pode se apresentar na forma neural pura, sem lesões cutâneas e com espessamento do tronco nervoso, capaz de causar danos neurais graves. Além disso, pode acometer crianças, geralmente com lesões na face.

(C) *Dimorfa ou Borderline (MB)*: baciloscopia geralmente positiva, com manchas avermelhadas ou esbranquiçadas de bordas mal delimitadas e

elevadas. Há perda de sensibilidade e diminuição de funções autonômicas. Geralmente apresenta comprometimento assimétrico de membros periféricos, podendo ou não apresentar dor. Apresenta-se após longo período de incubação (> 10 anos).

(D) *Virchowiana (MB)*: é a forma mais avançada e contagiosa da doença, apresentando baciloscopia positiva, ausência de manchas visíveis, mas com a pele de aspecto de casca de laranja (avermelhada, seca, poros dilatados) exceto em áreas quentes (axila, couro cabeludo), podendo apresentar também dor nas articulações. Com a evolução da doença, surgem caroços escuros (hansenomas), queda de pelos, infiltração (falta de rugas), membros roxos e formigando, lesões na mucosa nasal, falta de sudorese e perda de sensibilidade.

No caso de avaliação dermatológica e neural inconclusiva ou de danos neurais sem lesões, pode ser realizado o exame de baciloscopia, buscando identificar a bactéria em amostra intradérmica das lesões. Neste caso, é realizada uma análise microscópica para observar a presença de bacilos isolados ou globias (aglomerado de bacilos) (FIGURA 1.2)<sup>32</sup>. Entretanto, a baciloscopia é uma técnica invasiva, utilizada apenas quando os sintomas se tornam visíveis, não sendo realizada em pacientes assintomáticos. Além disso, embora os métodos microscópicos sejam relativamente de baixo custo, apresentam baixa sensibilidade<sup>33</sup>, não sendo eficazes em diagnosticar a doença antes que os danos se tornem irreversíveis.

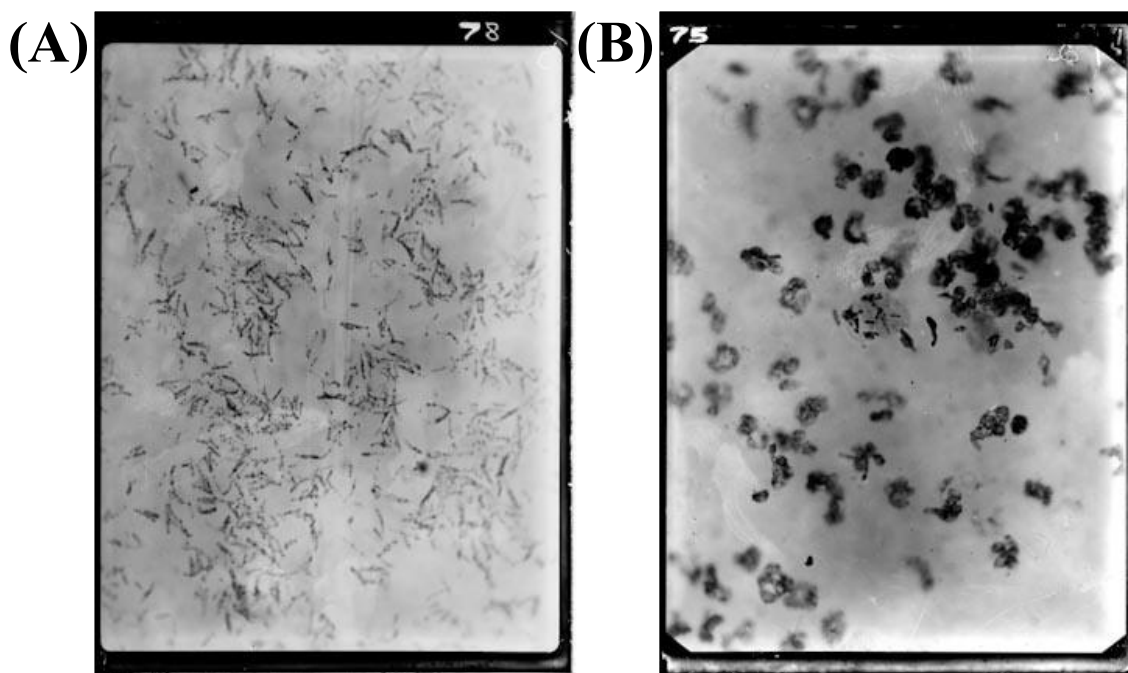


FIGURA 1.2 - Fotomicrografia de (A) bacilos isolados e (B) globias da *M. leprae*.

Fonte: Instituto Oswaldo Cruz<sup>34,35</sup>.

Quando o exame clínico e a baciloscopia ainda assim não levam a um resultado conclusivo, outros exames podem ser requeridos, tais como histopatologia<sup>36</sup>, ultrassom de nervos periféricos<sup>37</sup> e eletroneuromiograma<sup>38</sup>. Geralmente, são análises realizadas visando o diagnóstico diferencial com outras doenças dermatológicas (ex.: vitiligo, eczemátide) e neurológicas (ex.: lesões por esforço repetido, neuropatia diabética).

Os procedimentos completos indicados pelo Ministério da Saúde para diagnóstico de hanseníase em indivíduos não contactantes (atenção básica e especializada) podem ser conferidos na FIGURA 1.3<sup>39</sup>.

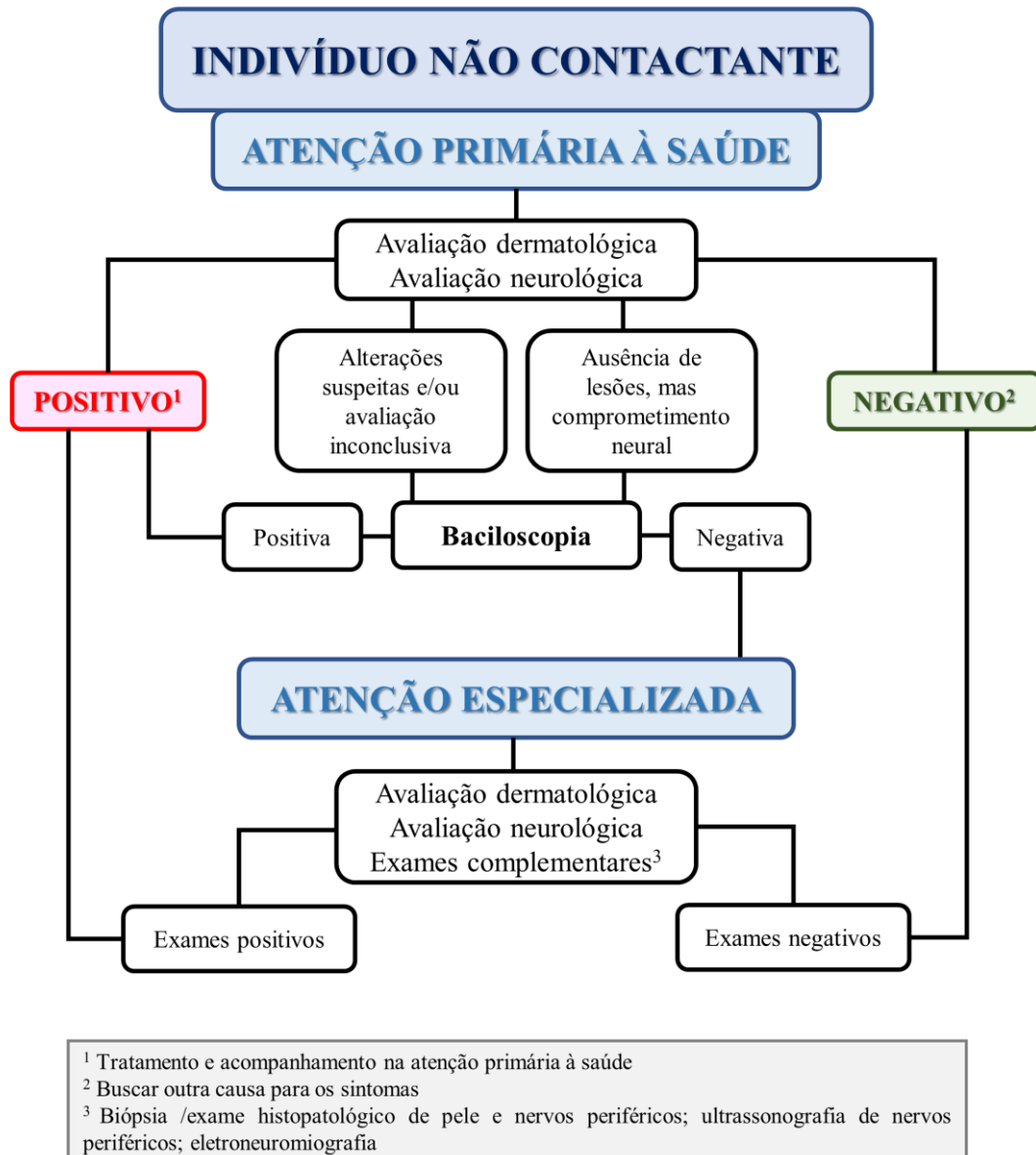


FIGURA 1.3 - Fluxograma de diagnóstico de hanseníase para indivíduos não contactantes com sintomas.

Fonte: Ministério da Saúde<sup>39</sup>.

### 1.2.2 – *Indivíduo contactante*

Consideram-se contatos de indivíduos com hanseníase pessoas que tenham residido no mesmo domicílio nos últimos 5 anos, sendo familiar ou não. Estudos apontam que estes contatos intradomiciliares apresentam maior possibilidade de desenvolver a doença, de modo que devem ser avaliados clinicamente<sup>39</sup>.

Em geral, a primeira medida tomada ao identificar um caso de hanseníase é a oferta da revacinação com a vacina BCG para quem ainda não recebeu as duas doses. No Brasil, a BCG é uma vacina obrigatória para crianças com menos de 1 ano de idade e protege das formas graves de tuberculose. É preparada a partir da *Mycobacterium bovis*, um tipo de micobactéria bovina com similaridade com a *M. leprae* e a *M. tuberculosis*. Devido à essa semelhança, estima-se que a revacinação com a BCG influencia na melhora da imunidade, tornando o indivíduo mais resistente ao bacilo<sup>40,41</sup>.

O monitoramento destes contatos é realizado continuamente pelo sistema de saúde, com exames clínicos e neurológicos frequentes. Os exames complementares (baciloscopia e histopatologia) são parte deste acompanhamento, além de outros específicos para a reação do monitoramento, incorporados recentemente<sup>39</sup>.

Recentemente, um teste molecular de reação de cadeia em polimerase em tempo real (qPCR) foi integrado ao SUS, sendo realizado em amostras de pele e nervos. Exames de PCR são considerados de alta eficiência para detectar diversas doenças, obtendo os melhores resultados para detecção de pacientes PB<sup>42</sup>. Este teste, entretanto, é indicado para uso exclusivo em contatos de pacientes com hanseníase confirmada, realizando assim um monitoramento durante determinado período de tempo para avaliar se o bacilo está presente na amostra e se está se reproduzindo<sup>39,43</sup>. Além disso, PCR é uma técnica dispendiosa, que exige equipe treinada e um laboratório de análises centralizado. Isso aumenta o custo envolvido nas análises, bem como o tempo entre a coleta do material e o resultado, tornando-a pouco acessível para locais distantes dos centros urbanos e com poucos recursos<sup>44,45</sup>. Deste modo, o exame é solicitado diretamente ao Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN) apenas em casos em que os demais exames são considerados inconclusivos.

Também utilizado apenas na avaliação de contatos, há um teste rápido imunocromatográfico chamado *ML-Flow*<sup>46,47</sup>. Este teste baseia-se na

detecção de anticorpos IgM por meio da imunorreacção com o glicolípido fenólico-1 (PGL-I, específico da *M. leprae*). Como apresenta alta sensibilidade para casos MB, o *ML-Flow* pode ser utilizado para o diagnóstico diferencial de maneira complementar. Contudo, estudos epidemiológicos demonstram alta taxa de resultados falsos-positivos em áreas endêmicas, bem como baixa sensibilidade para casos PB<sup>48</sup>. Assim, embora o resultado rápido possa contribuir para a orientação do tratamento, também deve ser avaliado com cautela, não sendo indicado seu uso isoladamente<sup>39</sup>.

Os procedimentos completos indicados pelo Ministério da Saúde para diagnóstico de hanseníase em contatos de casos confirmados (atenção básica e especializada) podem ser conferidos na FIGURA 1.4<sup>39</sup>.

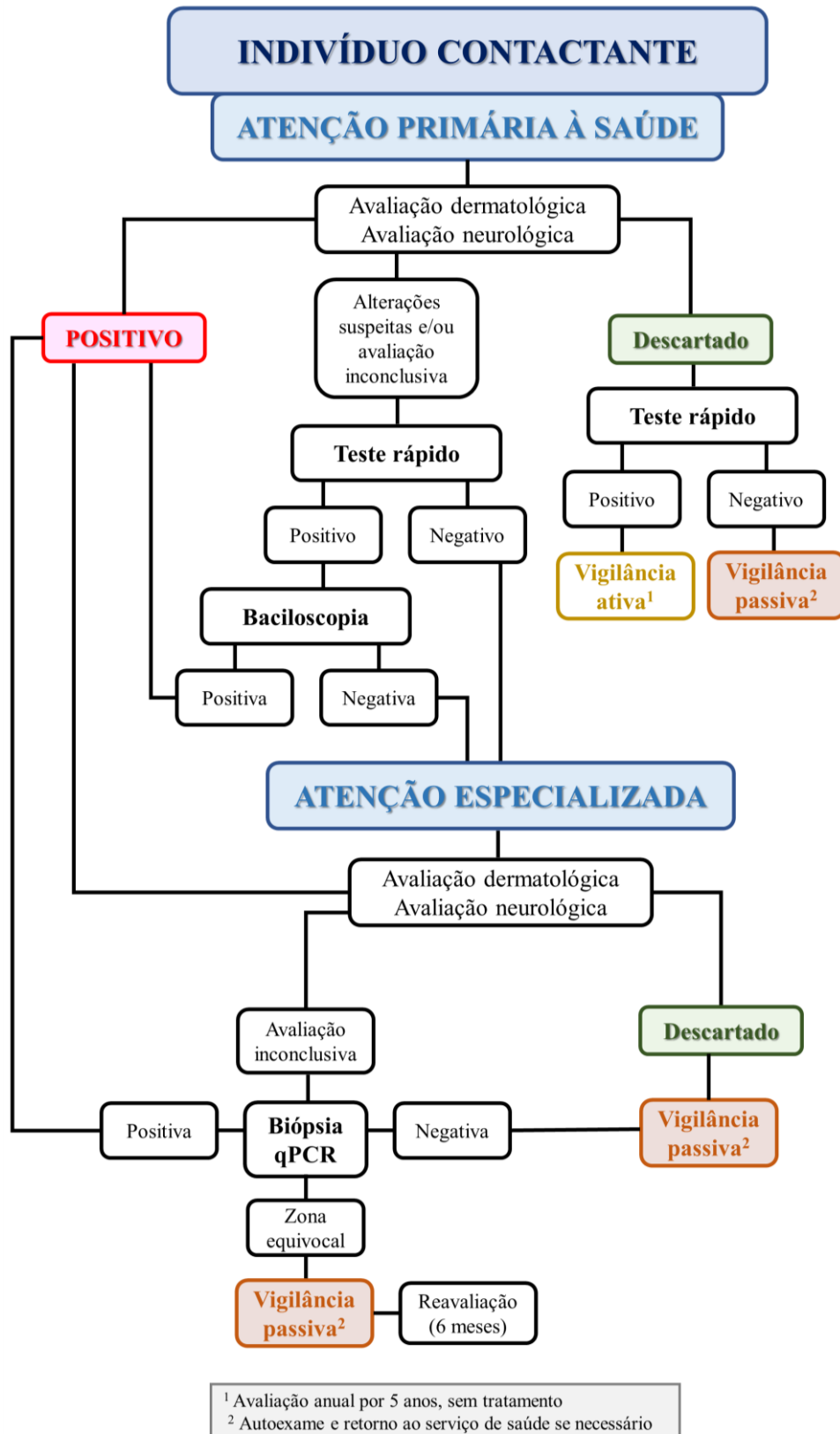


FIGURA 1.4 - Fluxograma de diagnóstico de hanseníase para contatos de caso de hanseníase confirmado.

Fonte: Ministério da Saúde<sup>39</sup>.

### 1.2.3 – Diagnóstico de hanseníase na literatura

Na literatura, existem diversos trabalhos referentes à detecção da *M. leprae*, especialmente utilizando PCR em diferentes amostras biológicas de origem humana, tais como mucosa nasal<sup>49</sup>, urina<sup>50</sup>, sangue<sup>51</sup>, soro<sup>52</sup>, saliva<sup>53</sup> e pele<sup>54</sup>, e animais selvagens livres e em cativeiro<sup>55</sup>. Embora sejam eficientes para detectar casos MB, devido à lenta multiplicação do bacilo, o PCR pode não identificar casos recém infectados ou PB, levando à altas taxas de falsos-negativos. Além disso, exigem uma quantidade grande de reagentes e amostras, o que os torna caros e, conseqüentemente, pouco acessíveis à população que mais necessita<sup>56</sup>.

Além do PCR, outras técnicas são exploradas na literatura, incluindo o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA, do inglês *enzyme-linked immunosorbent assay*)<sup>57</sup> e os testes imunocromatográficos, também chamados de ensaios de fluxo lateral (do inglês, LFA – *lateral flow assays*)<sup>58</sup>. No ELISA, os anticorpos presentes no soro do paciente ligam-se à antígenos imobilizados em uma superfície sólida (placa de ELISA). Um segundo anticorpo conjugado à enzima peroxidase liga-se então ao anticorpo do paciente. Em seguida, adiciona-se o substrato, que leva à uma reação catalisada pela enzima. Essa reação gera uma mudança de coloração, medida espectrofotometricamente<sup>59</sup>. Para diagnóstico de hanseníase, o ELISA é o teste sorológico mais comumente encontrado, apresentando em geral bons resultados de especificidade e sensibilidade para casos MB, porém a taxa de identificação dos indivíduos PB é baixa<sup>60-62</sup>.

O LFA, também conhecido como teste rápido, é aplicado comercialmente para diagnóstico de diversas doenças. Suas principais vantagens são o tempo de análise (geralmente 15 minutos) e a facilidade com que o teste é realizado, sem necessitar de pessoal qualificado para coletar ou interpretar o resultado. Geralmente, são qualitativos, porém podem ser acoplados à uma tecnologia de leitura para a quantificação do alvo. Estes testes utilizam uma membrana de nitrocelulose, que é percorrida pela amostra do indivíduo. Na linha



de teste, estão os reagentes que se ligam especificamente ao alvo e, caso o teste dê positivo, uma linha colorida se formará<sup>63-65</sup>. Para hanseníase, no entanto, seu uso é limitado devido ao baixo título de anticorpos em pacientes PB, o que aumenta a taxa de falsos-negativos em testes sorológicos. Deste modo, o desenvolvimento de LFA visa principalmente identificar os casos MB<sup>46,47,66</sup>.

Uma vez que existe um tratamento eficiente, o maior desafio para o controle da doença é o diagnóstico precoce, identificando a bactéria antes que os sintomas se manifestem. Entretanto, não existem ainda em análises de rotina métodos acessíveis, rápidos e pouco invasivos que consigam detectar com alta acurácia a presença da *M. leprae* em pacientes PB e em contatos de casos confirmados, evitando assim a contaminação de outras pessoas e aumentando as chances de cura sem sequelas. Neste contexto, o desenvolvimento de novos testes sorológicos pode revolucionar o cenário atual da doença.

### 1.3 – Imunoensaios e imunossensores

Os imunoensaios são métodos de análise baseados na interação entre anticorpo e antígeno. Anticorpos são proteínas produzidas pelos linfócitos B para neutralizar a ação de uma ameaça detectada no organismo – o antígeno. Qualquer espécie ou composto que desencadeie uma reação do sistema imune pode ser considerada um antígeno, de substâncias (toxinas, alérgenos) à patógenos (vírus, protozoários, bactérias, fungos)<sup>67-69</sup>.

Os anticorpos ou imunoglobulinas (Ig) são estruturados por duas cadeias leves (~23 kDa) e duas cadeias pesadas (~50 kDa) de polipeptídeos, ligadas entre si por pontes dissulfeto (FIGURA 1.5). Cada anticorpo é constituído de uma região constante e uma região variável. A região constante é similar para todos os anticorpos da mesma classe. Os humanos apresentam cinco classes de anticorpos (IgM, IgG, IgA, IgD e IgE), cada qual com uma função e janela de detecção<sup>70,71</sup>. As classes mais utilizadas em imunoensaios são os IgM para detectar infecções recentes e os IgG para identificar infecções mais antigas. Em

especial, os IgG são os anticorpos mais abundantes (75%) e meia-vida mais longa (~ 23 dias) no soro. Também chamado de anticorpo de memória, ele continua sendo sintetizado pelo organismo mesmo anos após a infecção sistêmica, sendo uma ferramenta valiosa contra reinfecções<sup>72,73</sup>. Por sua vez, a região variável de um anticorpo é designada para a ligação com o antígeno, podendo ligar-se especificamente a duas moléculas por vez. Desta forma, esta região varia de alvo para alvo, garantindo a especificidade da ligação<sup>67,68</sup>.

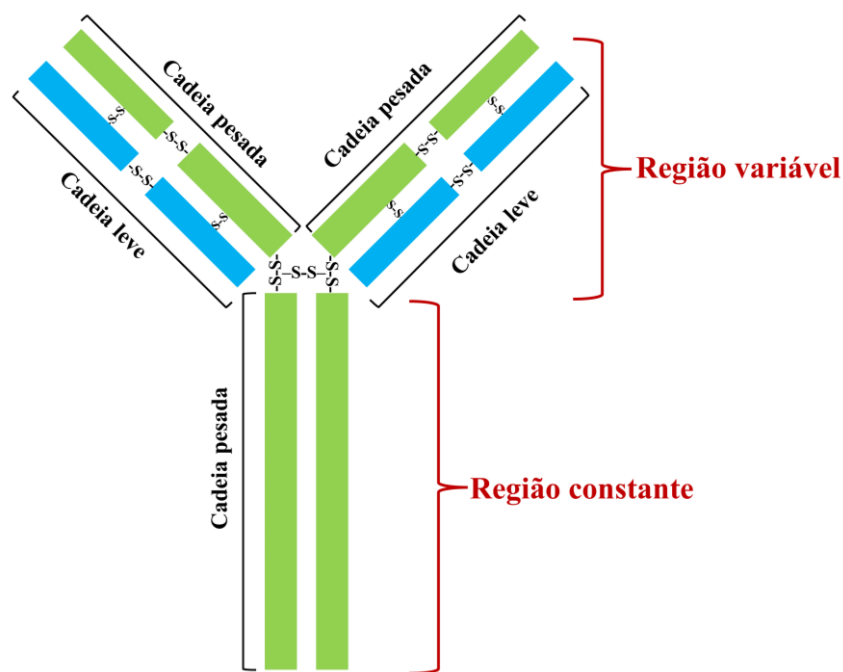


FIGURA 1.5 - Estrutura de um anticorpo. Em azul as cadeias leves e em verde as cadeias pesadas, ligadas por pontes dissulfeto (-S-S-).

Fonte: Adaptado de Kellie e Al-Mansour<sup>74</sup>.

Também baseados na formação de um complexo imune (FIGURA 1.6), os imunossensores são um tipo de biossensor formado essencialmente por um componente biológico (biorreceptor) que garante a especificidade da resposta e uma plataforma transdutora, responsável por converter a reação de bioreconhecimento entre biorreceptor e analito em um sinal elétrico<sup>75,76</sup>.



FIGURA 1.6 - Formação do complexo imune.

Fonte: Adaptado de Almeida *et. al*<sup>77</sup>.

Frente aos demais métodos, o uso de imunoenaios e imunossensores apresenta alta especificidade e sensibilidade, possibilidade de miniaturização e obtenção de resultados rápidos, o que os torna potencialmente mais acessíveis e com alta frequência analítica. Além disso, podem fornecer dados qualitativos ou quantitativos, de acordo com o objetivo para o qual foi desenvolvido. Eles vêm sendo desenvolvidos visando aplicações em diferentes frentes, como monitoramento ambiental<sup>78,79</sup>, controle de qualidade de alimentos<sup>80,81</sup> e, especialmente, em análises clínicas<sup>82,83</sup>.

O biorreceptor é responsável pela especificidade da detecção e, por isso, deve ser escolhido com cautela. Para diagnósticos, é comum o uso de imunoenaios para monitorar uma substância relacionada à doença que se quer identificar. Essas substâncias são biomarcadores, moléculas cuja atividade é diretamente ligada à processos biológicos, de modo que sua concentração varia quando o organismo apresenta alguma reação anormal. Deste modo, qualquer proteína relacionada à um processo biológico cuja concentração possa ser monitorada é passível de ser aplicada como um biomarcador<sup>84,85</sup>.

A estratégia de detecção dos imunoenaios pode variar conforme as particularidades da análise – tipo de amostra, alvo escolhido, objetivo da detecção. Com relação à escolha do alvo e do biorreceptor, há dispositivos que utilizam anticorpos como componentes para detectar um antígeno específico<sup>86,87</sup>. Estes são

comumente utilizados para identificar a fase aguda de uma infecção, podendo fornecer dados acerca da origem e intensidade da doença. Por exemplo, há proteínas que podem ser monitoradas para identificar se uma determinada condição é causada por um vírus ou uma bactéria<sup>88,89</sup>.

Há também sistemas cujo objetivo é detectar anticorpos, utilizando para isso um antígeno<sup>90,91</sup>. Estes são chamados de *métodos sorológicos*. Usar um anticorpo como biomarcador pode ser uma ferramenta valiosa para monitorar a resposta imune causada por uma infecção ou por uma vacina, avaliando quanto tempo os anticorpos produzidos permanecem ativos no organismo<sup>92</sup>. Assim, é possível estimar se a doença pode ser contraída novamente, se a vacina é eficaz e em quanto tempo deve ser reforçada. Além disso, a detecção de anticorpos é valiosa quando se trata de uma doença com longo tempo de incubação ou cujos demais biomarcadores proteicos apresentam concentração abaixo do detectável. Os métodos sorológicos podem ser realizados em amostras de sangue, plasma ou soro. Destes, o soro é o mais comum por conter praticamente as mesmas proteínas encontradas no sangue total, com exceção àquelas envolvidas na coagulação. Ademais, embora o plasma apresente maior quantidade de proteínas diferentes, as proteínas presentes no soro são mais estáveis, de modo que as amostras podem ser armazenadas por tempo maior sem que a detecção seja prejudicada<sup>93</sup>.

O mecanismo de detecção também pode variar, sendo os mais comuns a detecção direta e a indireta. Os ensaios diretos utilizam o analito marcado para reconhecimento pelo biorreceptor e posterior monitoramento. Embora seja uma estratégia simples, há pouca amplificação do sinal analítico e, conseqüentemente, menor sensibilidade. Além disso, a escolha do marcador é limitada. Os ensaios indiretos usam um segundo anticorpo marcado que reconhece o analito, cujo marcador gera a resposta. Utilizando esta estratégia, é possível desenvolver métodos mais sensíveis quando comparados com os métodos de detecção direta. Atualmente, há uma ampla variedade de anticorpos marcados disponíveis no mercado capazes de amplificar o sinal analítico, o que

torna estes sistemas mais versáteis sem a necessidade de uma etapa adicional de marcação<sup>94-97</sup>.

Ensaio indiretos são particularmente utilizados em métodos de detecção eletroquímica, uma vez que anticorpos e antígenos em geral não são eletroativos. Neste caso, os marcadores escolhidos devem estar envolvidos em um processo de redução ou oxidação em um determinado potencial – assim, pode-se detectar eletroquimicamente a atividade do próprio marcador (ex.: nanopartículas metálicas) ou de um substrato (ex.: enzimas). Além disso, o marcador deve ser estável frente aos demais componentes da matriz, não ligando-se ou reagindo com possíveis interferentes<sup>98</sup>. Os marcadores mais comuns são as enzimas devido à sua capacidade catalisadora que amplifica o sinal analítico, tornando o método mais sensível. Assim como todos os marcadores, é necessário que a enzima escolhida tenha alta seletividade ao substrato e que este seja estável em tampão, de modo a não sofrer interferências da amostra ou do pH<sup>99,100</sup>.

Imunoensaios e imunossensores apresentam alta sensibilidade e facilidade de manipulação de amostras, sendo ideais para determinação de doenças precocemente. Neste sentido, pode-se encontrar na literatura trabalhos acerca do desenvolvimento de imunoensaios no diagnóstico de hanseníase.

### *1.3.1 – Imunoensaios para diagnóstico de hanseníase*

Imunoensaios vêm sendo desenvolvidos para o diagnóstico de hanseníase, buscando sistemas sensíveis e capazes de identificar a doença preliminarmente. O alvo mais comum é PGL-I e seus anticorpos (anti-PGL-I)<sup>101-103</sup>, especialmente IgM<sup>63</sup>. A exemplo, Spencer *et. al*<sup>104</sup> avaliaram a eficiência de antígenos da *M. leprae*, dentre eles o PGL-I. Este antígeno mostrou-se altamente sensível para pacientes MB, porém apresentou uma taxa de identificação de 20 – 40% para casos de hanseníase tuberculóide e borderline (casos no limite entre PB e MB). Ademais, os autores avaliaram que contatos domiciliares de casos

confirmados que apresentaram resultados de anti-PGL-I positivos têm cerca de seis vezes mais chance de desenvolver a doença.

Assim, embora seja eficiente em detectar casos MB, testes de PGL-I não apresentam alta sensibilidade aos pacientes PB. Ademais, é comum que indivíduos saudáveis de zonas endêmicas apresentem anticorpos anti-PGL-I, levando à uma alta taxa de resultados falsos-positivos. Indivíduos com tuberculose, doença causada pela *Mycobacterium tuberculosis*, também podem ser uma fonte de falsos diagnósticos devido à elevada taxa de reação cruzada e similaridade entre as bactérias<sup>104</sup>. Neste sentido, o uso de proteínas recombinantes e peptídeos sintéticos como antígenos pode ser uma alternativa específica e sensível para detecção de anticorpos anti-*M. leprae*, capaz de tornar os testes sorológicos mais eficientes<sup>105</sup>.

Além dos biomarcadores convencionais, vêm-se realizando estudos acerca de alvos sintéticos, como peptídeos e proteínas recombinantes. Neste sentido, é possível obter resultados promissores, minimizando reações cruzadas com outras micobactérias e aumentando significativamente a sensibilidade do método de diagnóstico.

## 1.4 – Peptídeos sintéticos

Os peptídeos são moléculas orgânicas formadas por dois ou mais aminoácidos, com peso molecular abaixo de 6000 Da. A ligação entre os aminoácidos é chamada de *ligação peptídica*, sendo uma ligação covalente estabelecida entre a carboxila de um aminoácido e a amina de outro. Quando o peptídeo é formado por mais de 50 aminoácidos e apresenta peso molecular alto (> 6000 Da), recebe o nome de proteína<sup>106,107</sup>.

Devido à facilidade de produção por métodos químicos, os peptídeos sintéticos vêm sendo utilizados para diversos objetivos, como a identificação e quantificação de peptídeos biologicamente ativos, estudo da relação entre estrutura e atividade biológica, para fins terapêuticos e de imunologia e no

desenvolvimento e aprimoramento de métodos analíticos. Além disso, quando comparado com o uso de proteínas totais, os peptídeos são mais versáteis quimicamente, podendo realizar reações orgânicas que não seriam possíveis com moléculas maiores<sup>108-110</sup>.

Para o desenvolvimento de imunoenaios, em geral, os peptídeos mimetizam regiões específicas dos epítomos de proteínas antigênicas, garantindo a minimização de reações inespecíficas. Assim, seu uso aprimora a sensibilidade e especificidade destes sistemas, o que leva a maior eficiência e menor custo final do ensaio<sup>111</sup>. O uso de peptídeos sintéticos é particularmente interessante quando a proteína antigênica de interesse é de difícil aquisição e produção, como é o caso da *M. leprae*, que não pode ser cultivada *in vitro* devido ao seu longo tempo de incubação. Considerando que a especificidade de uma ligação antígeno-anticorpo se deve à conformação dos peptídeos que formam seu epítomo, identificar um fragmento deste epítomo e aplica-lo como antígeno pode tornar o ensaio mais simples, barato e sensível frente ao uso da proteína<sup>108,112</sup>. Assim, pode-se utilizar como antígeno peptídeos sintéticos derivados das sequências de aminoácidos das proteínas da *M. leprae* para detectar anticorpos específicos<sup>113-115</sup>.

Neste contexto, o trabalho apresentado utilizou duas sequências peptídicas: uma obtida da proteína 85B, presente no epítomo da *M. leprae*, e uma sequência obtida da proteína recombinante ML0405.

#### 1.4.1 – Antígeno 85B (Ag85B)

O antígeno 85 é um complexo formado pelas proteínas 85A, 85B e 85C, presente exclusivamente em todas as micobactérias. Estas proteínas são essenciais no processo de biossíntese da parede celular e são diretamente relacionadas com a patogenicidade das micobactérias<sup>116-118</sup>. Na *M. leprae*, a proteína 85B é a mais abundante do complexo 85. Deste modo, apresenta grande potencial para mapeamento e identificação de epítomos que podem ser utilizados para fins de diagnóstico<sup>119,120</sup>.

A exemplo, Alban *et al.*<sup>109,121</sup> utilizaram uma biblioteca *phage display* para isolar possíveis peptídeo-alvo derivados da proteína 85B, avaliando a resposta celular induzida pelas sequências encontradas. Foram obtidas três sequências reativas e capazes de diferenciar pacientes com hanseníase e indivíduos saudáveis. Estas sequências peptídicas foram aplicadas na detecção sorológica da *M. leprae* em pacientes hansenianos, contatos intradomiciliares, pacientes com tuberculose e indivíduos saudáveis de zonas endêmicas. Destes, foram identificados 73,9% dos casos MB, indicando que os peptídeos obtidos têm potencial de aplicação para diagnóstico.

Utilizando uma das sequências peptídicas que apresentou melhor resposta neste trabalho, de Santana *et al.*<sup>122</sup> desenvolveram um imunoensaio para detecção de *M. leprae*. Com a microbalança de cristal de quartzo (QCM, do inglês *Quartz Crystal Microbalance*), esse sistema foi capaz de detectar anticorpos específicos em pacientes MB e PB de diferentes regiões brasileiras, indicando a sensibilidade e especificidade do diagnóstico. Além disso, foi capaz de distingui-los de maneira eficaz dos infectados com tuberculose e vacinados com BCG, indicando que não houve reação cruzada entre a *M. leprae* e a *M. tuberculosis*.

#### 1.4.2 – Antígeno ML0405

A ML0405 é uma proteína recombinante homóloga à proteína Rv3616c da *M. tuberculosis* e não apresenta função conhecida. Devido à sua capacidade de reconhecimento por anticorpos anti-*M. leprae*, pode ser utilizada como biomarcador para hanseníase. Estudos indicam que, além do diagnóstico, o uso da ML0405 pode ser realizado para acompanhamento do tratamento, uma vez que pode-se observar queda no título de anticorpos conforme o tempo decorrido do início da medicação<sup>123</sup>.

Juntamente com a proteína ML2331, também biomarcador de hanseníase, a ML0405 foi avaliada em soros de indivíduos controle, pacientes PB, MB e contatos intradomiciliares<sup>124,125</sup>. Os resultados apontam boa resposta para



identificar pacientes MB (87% dos pacientes identificados) e PB (69% dos pacientes identificados) nas amostras provenientes do Brasil. Além disso, não foi observada reatividade no soro dos contatos, o que possibilita o uso de ambas as proteínas para diagnóstico de casos MB mesmo em zonas endêmicas.

Embora, em geral, o uso de peptídeos sintéticos apresente maior especificidade e alta eficiência em detectar indivíduos MB, ainda há uma carência de plataformas de detecção sensíveis à casos PB. Além disso, busca-se o desenvolvimento de métodos que sejam de baixo custo e que permitam a sua aplicação até mesmo em regiões mais remotas, que são as que mais necessitam de acompanhamento. Neste sentido, o uso de nano e micropartículas em imunoenaios pode facilitar a aplicação do método em análises de rotina, tornando possível que o próprio profissional de saúde realize o exame de maneira simples e confiável.

## **1.5 – Partículas magnéticas em imunoenaios**

Métodos para detecção de biomoléculas baseados em partículas magnéticas (PMs) vêm sendo utilizados especialmente no desenvolvimento de ensaios voltados para o diagnóstico clínico<sup>126,127</sup>. A maioria das PMs utilizadas em imunoenaios são de óxido de ferro, como magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) ou maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ )<sup>128</sup>. Além disso, podem ser obtidas comercialmente em diferentes tamanhos e com diversos grupos funcionais em sua superfície, como aminas, carboxilas ou hidroxilas<sup>129</sup>.

O uso de PMs em imunoenaios (chamados assim de *magneto-imunoenaios*) apresenta inúmeras vantagens, especialmente devido à sua ampla área superficial, que possibilita um grande número de biomoléculas imobilizada para captura do alvo. Isso aumenta a sensibilidade destes sistemas frente à imunoenaios convencionais, levando também a um consumo menor de reagentes<sup>130</sup>.

Além disso, as PMs facilitam o processo de lavagem entre as etapas de conjugação devido às suas propriedades magnéticas. Com a aplicação de campos magnéticos externos (ímãs), é possível separar eficientemente as PMs e os compostos nela ancorados dos que estão presentes em excesso, eliminando-os. Esse processo é amplamente utilizado em trabalhos com matrizes biológicas reais, viabilizando a separação do alvo específico dos demais componentes da amostra<sup>126,129,131</sup>. A separação magnética também pode garantir a pré-concentração do analito, uma vez que o ensaio pode ser suspenso em um volume menor, garantindo assim amplificação do sinal analítico.

Recentemente, um magneto-ensaio para o diagnóstico de COVID-19 em saliva foi desenvolvido utilizando PMs<sup>132</sup>. Este trabalho fez uso de um peptídeo mimético da enzima conversora da angiotensina 2 (ACE-2) ancorado às PMs para captura da proteína spike (S) presente no vírus SARS-CoV-2. Posteriormente, foi realizada a detecção eletroquímica com nanopartículas de ouro (AuNPs) para aquisição do sinal analítico. O sistema apresentou alta sensibilidade de detecção e especificidade de captura do alvo, sendo eficiente em diferenciar os indivíduos saudáveis dos positivos para COVID-19, sem aplicar pré-tratamentos de amostra para extração e separação dos interferentes.

Pode-se, também, destacar a detecção da proteína de filtrado de cultura 10 (CFP10) e da proteína alvo antigênica secretora precoce 6 (ESAT6), ambos biomarcadores de tuberculose<sup>133</sup>. Este magneto-imunoensaio utilizou PMs revestidas com ouro e anticorpos ancorados para a captura do alvo em amostras de escarro. A sensibilidade e a especificidade alcançadas pelo sistema foi próxima de 100%, indicando sua eficiência.

Ademais, ao aliarmos PMs com métodos de detecção sensíveis, simples e de baixo custo – como os eletroquímicos –, é possível realizar a análise com elevada frequência analítica. Isso pode significar a aplicação do método de diagnóstico em regiões distantes dos centros urbanos, tornando-o mais acessível à população em geral.

## 1.6 – Dispositivos eletroquímicos descartáveis para análises clínicas

Os métodos de análise que utilizam as propriedades dielétricas na interface eletrodo/eletrólito para monitoramento de um analito podem ser chamados de eletroquímicos. Biossensores e bioensaios podem utilizar-se de plataformas eletroquímicas para a detecção da espécie de interesse, como por exemplo o sensor amperométrico de glicose, disponível no mercado desde 1962 até os dias de hoje. Este dispositivo utiliza a enzima glicose oxidase para monitorar o peróxido de hidrogênio gerado como produto da reação de oxidação da glicose<sup>76,134,135</sup>.

Frente aos métodos convencionais utilizados em análises de rotina, os que empregam dispositivos eletroquímicos apresentam vantagens como baixo custo de instrumentação, rapidez na obtenção dos resultados e nenhum ou mínimo preparo de amostra. Além disso, a alta sensibilidade alcançada por sensores eletroquímicos se destaca, possibilitando a aplicação em análises qualitativas ou quantitativas com baixos limites de detecção.

Biossensores eletroquímicos podem ser construídos utilizando diversos materiais, tornando os métodos flexíveis para diferentes aplicações e matrizes<sup>136–138</sup>. Eletrodos como o de carbono vítreo<sup>139,140</sup> e o de ouro<sup>141,142</sup> são amplamente utilizados como base para a construção destes sensores devido à sua facilidade de funcionalização, robustez e ampla janela de potencial. Entretanto, pensando na aplicação para diagnósticos clínicos, eletrodos descartáveis são mais interessantes por não necessitarem de um processo de renovação de superfície eletródica, o que diminui o tempo de construção do biossensor e seu custo, conseqüentemente aumentando sua frequência analítica<sup>98</sup>. Além disso, dispositivos descartáveis podem ser adaptados para *point-of-care testing* (POCT), ou seja, para que forneçam um diagnóstico rápido no próprio local de atendimento.

### 1.6.1 – Eletrodos serigrafados

Atualmente, há várias técnicas descritas na literatura para a construção de eletrodos totalmente descartáveis<sup>89,143–146</sup>. Pode-se destacar a técnica de serigrafia, que consiste em formar um filme de tinta condutora sobre a superfície de um substrato (geralmente polímero, cerâmica, tecido ou papel). Deste modo, a técnica necessita apenas da tinta, do material a ser usado como substrato, do molde com o *layout* do eletrodo, um rodo para a aplicação da tinta e um forno para cura<sup>147</sup>. Atualmente, existem eletrodos serigrafados (SPEs, do inglês *screen-printed electrodes*) comerciais<sup>148,149</sup>. Entretanto, o baixo custo e simplicidade do processo de produção em massa possibilitam a fabricação destes dispositivos em laboratório.

Como exemplo do uso da serigrafia na construção de SPEs, Afonso *et al.*<sup>150</sup> desenvolveram um método de fabricação utilizando tinta condutora de carbono e folhas de poliéster como substrato. Essas folhas são da classe dos termoplásticos, de modo que podem ser moldadas em altas temperaturas sem alterar suas propriedades químicas<sup>151,152</sup>. Deste modo, são facilmente transformadas em outros produtos, sendo recicláveis e conseqüentemente menos prejudiciais ao meio ambiente. Os autores utilizaram uma impressora de corte eletrônica para formar uma máscara negativa em vinil adesivo. O uso deste equipamento permitiu que o processo de serigrafia fosse realizado manualmente, sem a necessidade de uma máquina específica que utiliza máscaras de chapa fina de aço com o desenho do eletrodo<sup>153,154</sup>. Segundo os autores, o custo de um dispositivo para 8 análises simultâneas construído por este método é de cerca de US\$ 0,20, tornando-o mais barato do que os comerciais disponíveis.

A serigrafia é uma técnica simples e barata para produção em larga escala, que possibilita a construção de dispositivos em diferentes *layouts* e superfícies. Deste modo, pode-se produzir células eletroquímicas inteiras em tamanho miniaturizado, levando à um consumo de amostras e reagentes menor do que células convencionais<sup>150,155–157</sup>. Os SPEs começaram a ser produzidos na

década de 1990 e desde então vem sendo utilizados no desenvolvimento de biossensores descartáveis. Em especial, a facilidade de modificação da superfície eletrodica é um dos principais atrativos dos SPEs. Assim, é possível o uso de nanopartículas metálicas ou magnéticas, nanomateriais carbonáceos e polímeros condutores para melhorar a sensibilidade e a estabilidade do sensor. Isso proporciona uma larga variedade de estratégias que podem ser utilizadas para a construção do biossensor e a detecção da biomolécula de interesse<sup>147,158,159</sup>.

Utilizando o mesmo processo de produção de Afonso *et al.*<sup>150</sup>, ensaios para diversas doenças<sup>157,160-162</sup> aplicaram eletrodos serigrafados como plataformas de detecção. A maioria destes trabalhos utiliza arranjos com até 8 células eletroquímicas, possibilitando a realização de 8 análises simultâneas. Nestes sistemas, o consumo de reagentes e amostras tende a ser pequeno, o que é uma vantagem visando futuramente aplicá-los em análises de rotina. Em vista disso, busca-se cada vez mais miniaturizar estes sensores, tornando-os o mais barato e acessível possível, podendo ser facilmente convertidos para dispositivos POCT.

A FIGURA 1.7 apresenta diferentes *layouts* de dispositivos descartáveis produzidos pelo método de serigrafia proposto por Afonso *et al.*<sup>150</sup> em nosso grupo de pesquisa.

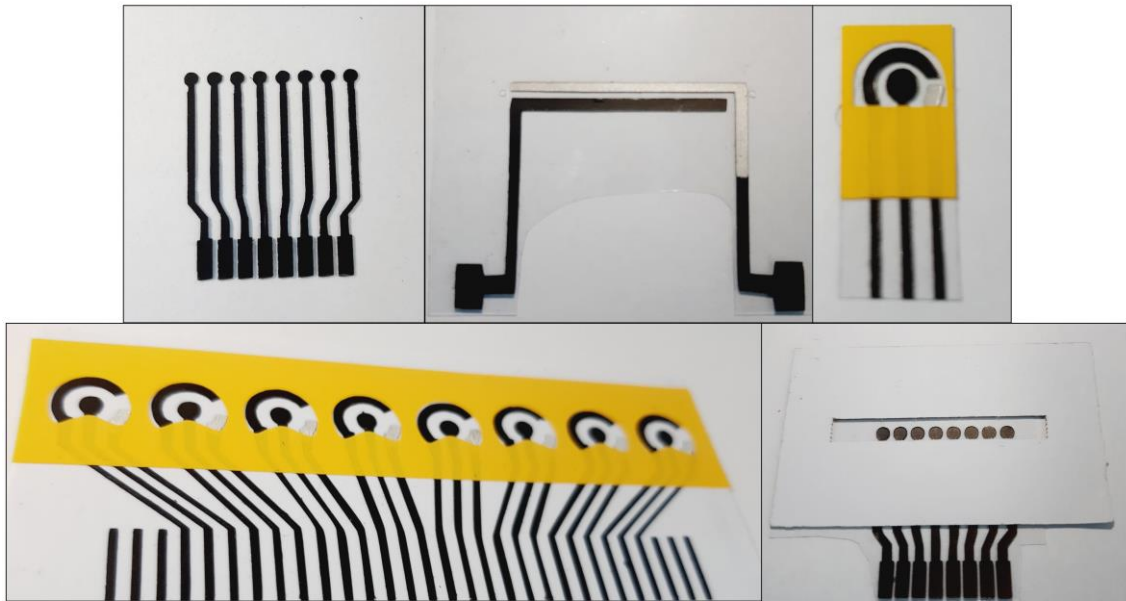


FIGURA 1.7 - Eletrodos serigrafados de diferentes *layouts*.

Fonte: A autora.

Além disso, pensando em posteriormente converter o sistema de detecção em um POCT, é necessário que o dispositivo seja seguro e o processo seja o mais automático possível. Neste sentido, sistemas microfluídicos podem ser utilizados, apresentando consumo baixo de reagentes e amostras, bem como semi-automatização da detecção.

## 1.7 – Sistema microfluídico

Um sistema microfluídico se refere à uma tecnologia que trabalha com transporte de fluidos em canais de dimensões micrométricas, devendo ao menos uma delas ser menor que 1 mm. Além disso, o volume interno máximo que o canal deve comportar é de 100  $\mu\text{L}$  para enquadrar-se na definição da microfluídica<sup>163,164</sup>. Deste modo, a principal vantagem dos sistemas microfluídicos é a possibilidade de realizar análises com volume de micro ou nanolitros de reagentes e amostras, o que diminui seu custo e gera poucos resíduos<sup>165</sup>.

Voltado para análises clínicas, o uso de dispositivos microfluídicos descartáveis compostos por SPEs apresentam simplicidade de fabricação e manuseio. Os sensores eletroquímicos não apresentam diminuição de sensibilidade significativa quando fabricados em tamanhos menores, tornando-os ideais para aplicação na microfluídica<sup>166</sup>. Além disso, a entrega dos fluídos à plataforma de detecção de maneira automática é capaz de tornar o sistema portátil e mais preciso, minimizando o manuseio dos insumos. Deste modo, há menor contato do analista com a amostra e os reagentes envolvidos no processo de detecção, o que diminui também o treinamento necessário para que o teste seja realizado e o risco de contaminação<sup>165,167</sup>.

A exemplo, recentemente Ortega *et al.*<sup>168</sup> desenvolveram um imunossensor microfluídico para detecção do antígeno prostático específico (PSA). O dispositivo microfluídico foi construído utilizando o polímero dimetil polissiloxano (PDMS) e a detecção do biomarcador foi realizada utilizando um *smartphone*. Além disso, a captura do PSA foi realizada ancorando o anticorpo anti-PSA em partículas magnéticas. Deste modo, o sensor desenvolvido apresentou alta sensibilidade, especificidade e portabilidade, sendo potencialmente aplicável como POCT.





***JUSTIFICATIVA E  
OBJETIVOS***

***Capítulo 2***

## **2 - JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS**

### **2.1 – Justificativa**

A hanseníase é uma doença infecciosa que atinge especialmente pessoas em situação de vulnerabilidade social. É considerada um problema de saúde pública, cujo Brasil é o segundo país no mundo em maior número de novos casos anuais. Neste contexto, é imprescindível o desenvolvimento de metodologias sensíveis para diagnóstico precoce da doença, uma vez que a identificação rápida irá permitir a quebra na cadeia de transmissão, impedindo o surgimento de novos casos. Além disso, um diagnóstico precoce diminui as chances de o indivíduo apresentar sequelas incapacitantes. Ressalta-se que, até o momento, não existe um procedimento ideal, capaz de detectar a presença da *M. leprae* antes do aparecimento dos sintomas com elevada especificidade. Portanto, faz-se necessário o desenvolvimento de ensaios e dispositivos sensíveis, estáveis e precisos, que possam ser aplicados facilmente em análises de rotina com elevada frequência analítica. Ademais, busca-se ensaios de baixo custo e com tempo total de análise reduzido, visando atender principalmente o público mais afetado pela doença.

### **2.2 – Objetivo Geral**

O objetivo desta tese foi desenvolver magneto-imunoensaios baseados em peptídeos sintéticos imunodominantes de proteínas da *M. leprae* para captura dos anticorpos anti-*M. leprae*, utilizando um dispositivo microfluídico descartável com detecção eletroquímica, visando o diagnóstico sorológico de hanseníase.

### 2.3 – Objetivos Específicos

- Avaliar a reatividade dos peptídeos imunodominantes, previamente caracterizados por mapeamento de epítomos (Limq - UFPR), frente a anticorpos anti-*M. leprae*;
- Construir dispositivos microfluídicos serigrafados descartáveis e avaliar sua robustez e estabilidade;
- Desenvolver magneto-imunoensaios utilizando os peptídeos sintéticos para detecção de anticorpos anti-*M. leprae*;
- Investigar as melhores condições dos imunoensaios visando melhor diferenciação entre amostras positivas e negativas para hanseníase;
- Estimar a precisão dos imunoensaios por meio do cálculo do desvio padrão relativo (DPR (%))
- Verificar a capacidade dos peptídeos em distinguir a reatividade de soros de indivíduos saudáveis, PB e MB.



***AVALIAÇÃO DOS  
SPCES E DA  
REATIVIDADE DOS  
PEPTÍDEOS SINTÉTICOS***

***Capítulo 3***

### **3 - AVALIAÇÃO DOS SPCEs E DA REATIVIDADE DOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS**

#### **3.1 – Procedimento experimental**

##### *3.1.1 – Reagentes e soluções*

Os reagentes 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), n-hidroxisuccinimida (NHS,  $\geq 99\%$ ), ácido ferroceno monocarboxílico (FMA, 98%), peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , 30% (m/v)), ácido 11-mercaptoundecanóico (MUA, 95%), 6-mercapto-1-hexanol (MHO, 97%), e etanolamina ( $\geq 99$ ) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). Dimetilsulfóxido (DMSO, 99,9%), ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 98%) e ácido clorídrico (HCl, 37%) foram obtidos da Synth. Fosfato de potássio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), fosfato de sódio dibásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), cloreto de potássio (KCl), cloreto de sódio (NaCl) e hidróxido de sódio (NaOH) foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha).

Na etapa de serigrafia dos eletrodos, foi utilizada tinta de carbono (Gwent-C2160602D2) e tinta de prata/cloreto de prata (GwentC2051014P10), ambas obtidas da Gwent Electronic Materials Ltd (Pontypool, UK).

A solução de FMA foi preparada em KCl  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  em pH 8,0. PBS  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  foi preparado em água ultrapura Milli-Q® (Millipore, Bedford, EUA) com NaCl  $137 \text{ mmol L}^{-1}$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$   $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   $1,8 \text{ mmol L}^{-1}$  e KCl  $2,7 \text{ mmol L}^{-1}$ . O pH foi ajustado utilizando NaOH e HCl, ambos na concentração de  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ .

Etanolamina  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$  foi preparada em água ultrapura, tendo seu pH ajustado com NaOH  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  para 8,0. Também em água ultrapura, foram preparadas soluções de EDC ( $200 \text{ mmol L}^{-1}$ ) imediatamente antes do uso, bem como a solução de NHS ( $50 \text{ mmol L}^{-1}$ ).

### 3.1.2 – Instrumentação e materiais

As folhas de poliéster e o vinil adesivo foram obtidos no comércio local de São Carlos/SP.

A construção dos SPCEs utilizou uma impressora de recorte doméstica Sillhouette Cameo (Silhouette, Brasil) e uma prensa térmica (F1 Suprimentos, Brasil). As medidas eletroquímicas foram realizadas em um multipotenciostato DropSens modelo ustat8000 (Metrohm, Espanha), acoplado a um computador pessoal.

Utilizou-se um pHmetro Digimed DM20 (Digimed, Brasil) para aferição de pH.

Para avaliar a eficiência da ligação peptídeo-anti-*M. leprae*, utilizou-se uma microbalança de cristal de quartzo (QCM, do inglês *quartzo crystal microbalance*) QCM200 (Suécia), acoplada à bomba de seringa (New Era Pumping System NE-1000, EUA). Um cristal de quartzo O100RX3 Ti/Au (Q-SENSE, Suécia) com 16 mm de diâmetro e com um filme de ouro polido de 100 nm de espessura foi utilizado para as análises. A frequência fundamental de oscilação deste cristal é de 5 MHz com um fator linear de sensibilidade ( $C_f$ ) igual à 17,7 Hz ng<sup>-1</sup> cm<sup>-2</sup>. A célula microfluídica utilizada nas análises de QCM foi fabricada em uma impressora 3D (Ender-3 Pro; CREALITY 3D®).

### 3.1.3 – Peptídeos sintéticos

Os peptídeos sintéticos avaliados são mimótopos mapeados de proteínas do epítipo da *M. leprae*, de modo a assegurar a seletividade da formação do imunocomplexo. Ambos foram avaliados preliminarmente pelo método de *spot-synthesis* pelo Laboratório de Imunoquímica (Limq) da Universidade Federal do Paraná (UFPR), sob coordenação da Professora Dra. Juliana Ferreira de Moura. Ambas as sequências são provenientes da Aminotech (Campinas, BR).

A primeira sequência (APDDPAWQNIFNLRR; patente BR1020150047800, código 19084, 95% de pureza) foi previamente descrita nos

trabalhos de Alban *et al.* (2013) e de Santana *et al.* (2018) e é derivada de uma parte da sequência de aminoácidos da proteína 85B. Como é proveniente de uma proteína altamente imunogênica, é um epítopo conformacional (composto por dobramento da proteína, deve manter a conformação original). Os epítomos conformacionais são gerados mais abundantemente que os epítomos lineares, de modo que a maioria dos anticorpos é capaz de reconhecê-los<sup>169</sup>. Este peptídeo foi aliquoteado em água ultrapura e mantido à -20°C até o uso, quando foi diluído em PBS pH 7,4 a concentração desejada.

A segunda sequência (SGLSQVTGLFGVPGL; código 19085, 95% de pureza) era inédita na literatura até o desenvolvimento deste trabalho, sendo derivada da proteína ML0405 (epítopo linear). Em geral, epítomos lineares tendem a apresentar resíduos que são funcionais à ligação com o anticorpo. Embora os epítomos lineares sejam menos antigênicos, eles apresentam alta estabilidade, uma vez que a desnaturação de sua estrutura não interfere na função de epítopo<sup>169</sup>. Este peptídeo foi aliquoteado em 10% DMSO e mantido à -20°C até o uso, quando foi diluído em tampão fosfato salino (PBS) pH 7,4.

Além destas sequências, foi utilizado um peptídeo não reativo para hanseníase como controle negativo de reatividade. Este peptídeo (<sub>24</sub>QAKTFLDKFNHEAEDLFYQ<sub>42</sub>C)<sup>132</sup> é derivado da proteína ACE2, amplamente estudada como alvo antigênico para detecção da proteína Spike do SARS-CoV-2. O peptídeo <sub>24</sub>QAKTFLDKFNHEAEDLFYQ<sub>42</sub>C foi aliquoteado em 8% de DMSO e mantido à -20 °C até o uso, quando foi diluído em PBS pH 7,4.

### 3.1.4 – Amostras de soro

A reatividade dos peptídeos foi avaliada utilizando duas amostras: (1) amostra de soro de indivíduo controle (provenientes do Paraná) e (2) amostra de indivíduo MB (provenientes do Mato Grosso).

Para a obtenção do soro, as amostras de sangue foram coletadas e centrifugadas por 10 minutos a 1000 x g em temperatura ambiente. Em seguida,



o soro foi armazenado à -20 °C até o uso. Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com a Declaração dos Princípios de Helsinque e aprovado por comitê de ético em (n° 1080.005.11.02, CEP/SD).

### 3.1.5 – Eletrodos serigrafados impressos de carbono (SPCE)

A célula eletroquímica utilizada para a detecção dos anticorpos anti-*M. leprae* era composta por um arranjo de oito eletrodos de trabalho, um eletrodo de referência e um contra-eletrodo, todos serigrafados com auxílio de uma impressora de corte eletrônica doméstica e o *software* Silhouette Studio para a construção das máscaras. Os eletrodos foram preparados conforme descrito por Afonso *et al.* (2016) e cada etapa está representada na FIGURA 3.1. Inicialmente, o desenho do molde foi recortado em uma folha de vinil adesivo (FIGURA 3.1A). Com o auxílio de uma pinça, as partes recortadas não desejadas foram removidas, formando uma máscara negativa (FIGURA 3.1B). Após, foi aplicada tinta condutora de carbono sobre a folha, de modo a recobrir o poliéster. A cura da tinta foi realizada em estufa, a 90 °C por 30 minutos (FIGURA 3.1C) e foram mantidos durante 30 minutos em estufa, a 90 °C para secagem. Os eletrodos de referência foram submetidos a pintura com a tinta de Ag/AgCl, aplicada com um pincel, seguida de cura a 60 °C por 30 minutos (FIGURA 3.1D). Por fim, o vinil adesivo foi removido dos arranjos (FIGURA 3.1E).

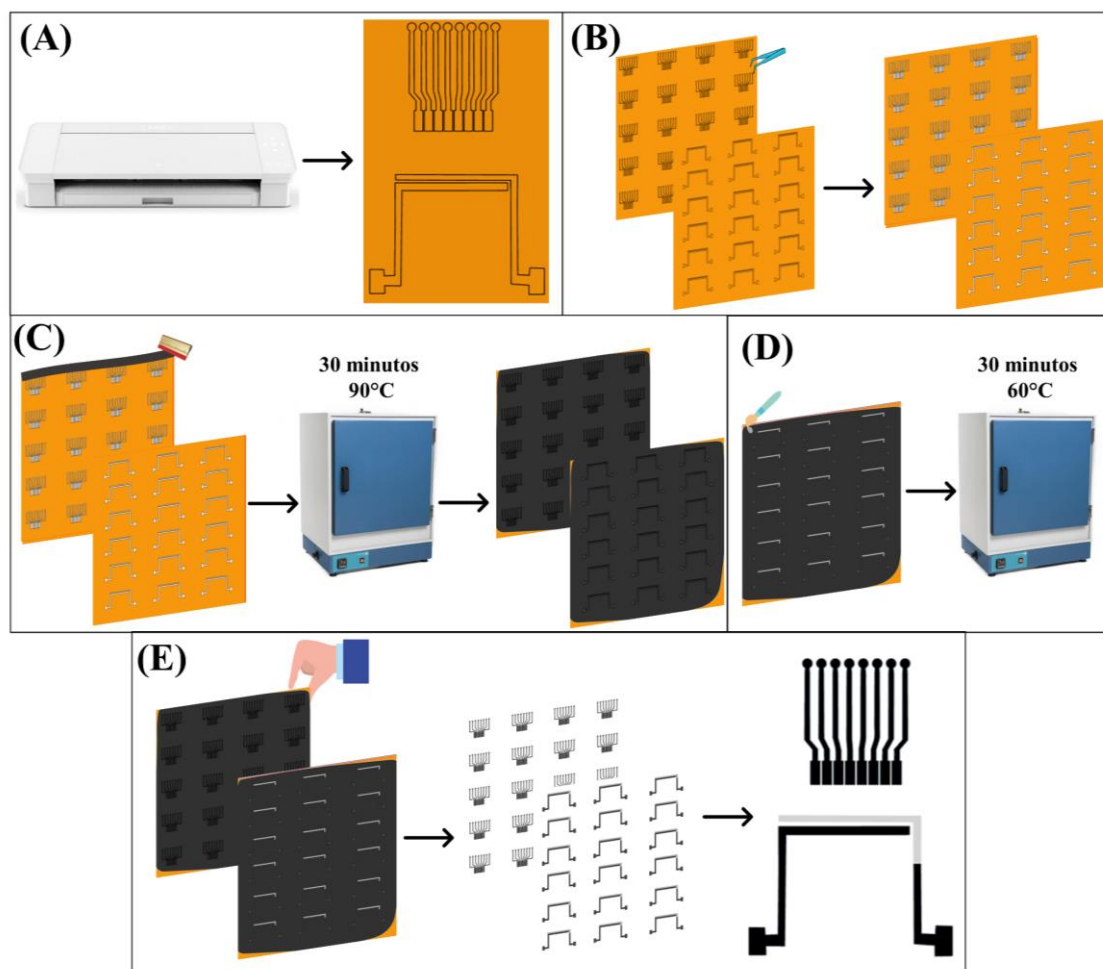


FIGURA 3.1 - Fabricação dos arranjos de eletrodos de trabalho, referência e contra-eletrodo.

Fonte: A autora.

### 3.1.5.1 – Estudo da robustez dos SPCEs

A robustez dos eletrodos serigrafados foi avaliada por meio de um planejamento experimental saturado de Plackett-Burman<sup>170</sup>. Este tipo de planejamento avalia os efeitos individualmente com variância mínima, considerando as interações entre as variáveis não significativas. Assim como nos demais planejamentos saturados, é possível avaliar até  $n - 1$  fatores, sendo  $n$  o número de experimentos realizados. Entretanto, no caso do Plackett-Burman, o mais correto é avaliar apenas  $n - 4$  variáveis reais, de modo que possam ser avaliadas também variáveis fantasma (também chamadas *dummy*). As variáveis fantasma representam mudanças imaginárias no sistema e servem para estimar o

erro dos efeitos principais, avaliando se alguma interação entre variáveis deve ser considerada <sup>171</sup>.

Deste modo, foram avaliadas 8 variáveis reais ( $Vn$ ) e 3 variáveis fantasmas ( $Fn$ ), sendo realizados 12 experimentos. Para a avaliação das variáveis reais, foram considerados dois níveis (um baixo e um alto) com pequena alteração frente à condição padrão utilizada no trabalho. Assim, foi possível analisar se os eletrodos são robustos frente à pequenas variações em seu processo de construção. As variáveis reais estão apresentadas na TABELA 3.1, bem como os valores reais utilizados no estudo.

TABELA 3.1 - Variáveis reais avaliadas no estudo de robustez

|           | <b>Variável</b>                          | <b>Nível baixo<br/>(-1)</b> | <b>Condição<br/>padrão (0)</b> | <b>Nível alto<br/>(1)</b> |
|-----------|--|-----------------------------|--------------------------------|---------------------------|
| <b>V1</b> | Operador*                                | Operador -1                 | –                              | Operador 1                |
| <b>V2</b> | Nº de demãos                             | 4                           | 6                              | 8                         |
| <b>V3</b> | Tempo de cura: tinta de carbono          | 28 min                      | 30 min                         | 32 min                    |
| <b>V4</b> | Temperatura de cura: tinta de carbono    | 85 °C                       | 90 °C                          | 95 °C                     |
| <b>V5</b> | Tempo de cura: tinta de Ag/AgCl          | 28 min                      | 30 min                         | 32 min                    |
| <b>V6</b> | Temperatura de cura: tinta de<br>Ag/AgCl | 55 °C                       | 60 °C                          | 65 °C                     |
| <b>V7</b> | Temperatura da prensa térmica            | 115 °C                      | 120 °C                         | 125 °C                    |
| <b>V8</b> | Tempo da prensa térmica                  | 180 s                       | 200 s                          | 220 s                     |

\* variável qualitativa.

Fonte: A autora.

O intuito deste estudo foi avaliar o processo de serigrafia, que é amplamente utilizado no grupo de pesquisa para construção de dispositivos de diversos *layouts*. Assim, optou-se por utilizar uma célula eletroquímica serigrafada simples (FIGURA 3.2), com diâmetro do eletrodo de trabalho de 3,0 mm, cujo processo de construção é exatamente o mesmo que o utilizado na construção das células eletroquímicas com 8 eletrodos de trabalho. Os resultados foram avaliados em função da oxidação do FMA, que é uma sonda redox

estabelecida na literatura. Ele tem sido utilizado em sensores eletroquímicos devido à alta eficiência, reversibilidade da reação redox, estabilidade e pouca influência do pH do meio<sup>172,173</sup>. Assim, utilizou-se a técnica de voltametria cíclica em 20  $\mu\text{L}$  de solução de FMA 1,0  $\text{mmol L}^{-1}$ , com uma velocidade de varredura ( $v$ ) de 100  $\text{mV s}^{-1}$  em um intervalo de potencial de ( $\Delta E$ ) 0,0 a 0,7 V.

Com base nos resultados obtidos para cada experimento, foi calculado um modelo de regressão linear, utilizando o *software* livre Octave, na versão *Guide user interface* (GUI), com a rotina computacional “*regression2*”<sup>174</sup>.

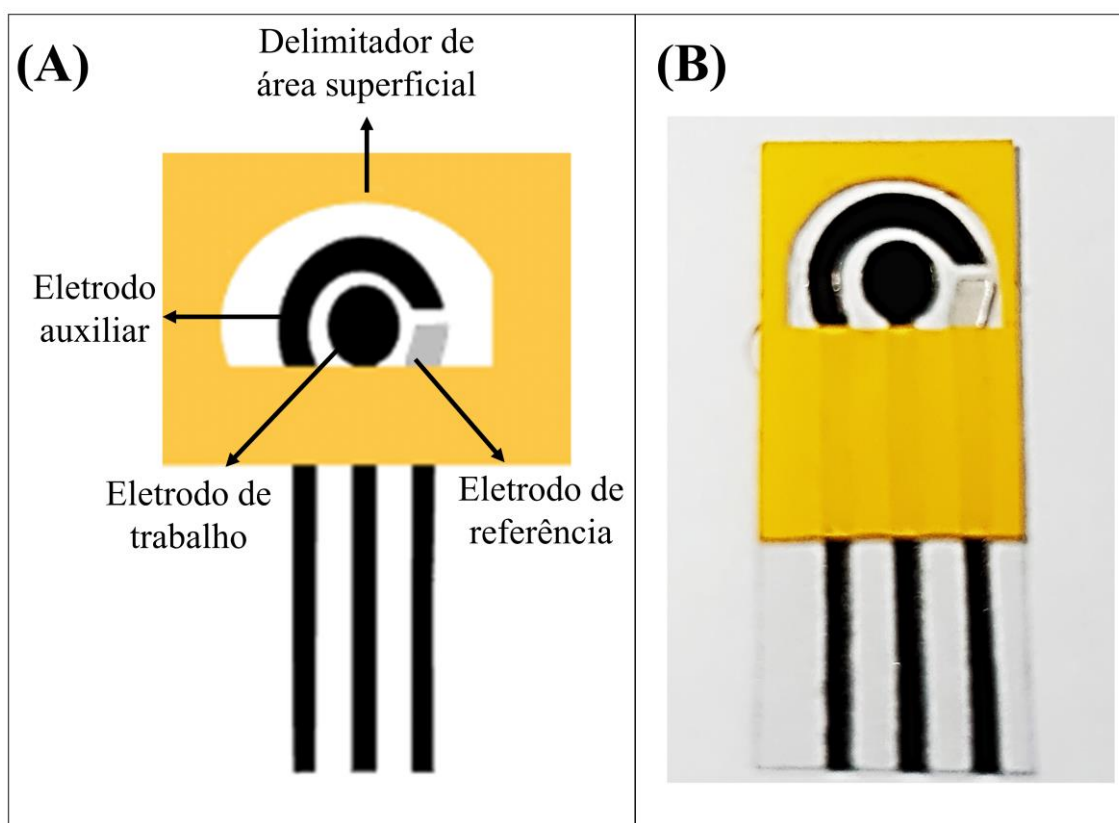


FIGURA 3.2 - (A) Esquema da célula eletroquímica simples utilizado neste estudo, com seus componentes. (B) Foto real da célula.

Fonte: A autora.

### 3.1.5.2 – Estudo da estabilidade dos SPCEs

Este estudo foi realizado visando estimar o tempo de prateleira (tempo de vida útil) das células eletroquímicas construídas por serigrafia. Deste

modo, utilizou-se novamente uma célula eletroquímica simples e a técnica de voltametria cíclica ( $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ ;  $\Delta E = 0,0$  a  $0,7 \text{ V}$ ).

As medidas foram realizadas em  $20 \mu\text{L}$  de solução de FMA  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  e um lote de eletrodos (construídos no mesmo dia) foi avaliado continuamente durante os primeiros 70 dias e ao longo de 23 semanas. Assim, para cada dia em que as análises foram realizadas, 3 eletrodos foram utilizados, obtendo-se triplicatas dos valores de corrente ( $I_p$ ) e potencial de pico ( $E_p$ ). Assim, observou-se queda de  $I_p$  e deslocamento de  $E_p$  em função do tempo decorrido para oxidação ( $I_{pOx}$ ,  $E_{pOx}$ ) e para redução ( $I_{pRed}$ ,  $E_{pRed}$ ), avaliando se houve degradação das tintas de carbono e de Ag/AgCl e conseqüente perda de atividade condutora.

Deste modo, os valores de  $I_p$  foram avaliados por meio do cálculo da porcentagem de queda do sinal, obtida pela EQUAÇÃO 3.1, sendo os valores de  $I_p$  1 e 2 referentes aos dias comparados. Além disso, todos os valores de  $I_p$  e  $E_p$  foram avaliados pelo desvio padrão relativo (DPR(%)), de modo a comparar a variabilidade dos dados com relação à média das respostas obtidas. O DPR foi calculado pela EQUAÇÃO 3.2, sendo  $DP$  o desvio padrão e  $\bar{X}$  a média.

$$Queda(\%) = \frac{I_{p1}}{I_{p2}} * 100 \quad (\text{EQUAÇÃO 3.1})$$

$$DPR(\%) = \frac{DP}{\bar{X}} * 100 \quad (\text{EQUAÇÃO 3.2})$$

### 3.1.6 – Avaliação da reatividade dos peptídeos

A especificidade da interação entre os peptídeos e os anticorpos anti-*M. leprae* foi avaliado por meio de QCM. Deste modo, a análise foi realizada com adição em fluxo de amostras de soro. Foram avaliadas duas amostras: uma hanseniana (MB) e uma saudável, visando observar pela variação de frequência se há diferença de massa na superfície do cristal.

Antes do uso, o cristal foi limpo com solução piranha ( $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}_2$ ; 3:1) por 2 minutos. Em seguida, foi lavado com água ultrapura em abundância e seco em fluxo de  $\text{N}_2$ .

Para a imobilização dos peptídeos específicos para hanseníase, foi aplicado sobre o cristal 100  $\mu\text{L}$  de uma solução etanólica contendo 11-mercaptoundecanóico (MUA)  $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  e 6-mercaptop-1-hexanol (MHO)  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ . O cristal foi mantido em câmara úmida por 15 h a temperatura ambiente e em seguida realizou-se lavagem com água ultrapura e etanol. Os grupos carboxila foram ativados utilizando EDC  $200 \text{ mmol L}^{-1}$  e NHS  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  em MES  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  pH 5,2 por 30 minutos, novamente em câmara úmida e temperatura ambiente. Após lavagem com PBS pH 7,4,  $80 \mu\text{g mL}^{-1}$  do peptídeo foram adicionados à superfície e mantidos por 1 h em câmara úmida a  $4^\circ\text{C}$ . O cristal foi então lavado com PBS-Tween 20 0,05% (m/v) e adicionou-se etanolamina ( $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ ) por 30 minutos para bloqueio de sítios de ligação não específicos. O processo pode ser observado esquematicamente na FIGURA 3.3A.

O peptídeo  ${}_{24}\text{QAKTFLDKFNHEAEDLFYQ}_{42}\text{C}$  (controle negativo) apresenta grupos tióis, de modo que sua imobilização na superfície do cristal não necessita de um processo de funcionalização. Deste modo,  $80 \mu\text{g mL}^{-1}$  do peptídeo foi adicionado à superfície e mantido por 1 h em câmara úmida a  $4^\circ\text{C}$ . Ademais, não foi necessário o bloqueio de sítios não específicos de ligação, uma vez que não foi realizada funcionalização e assim não há grupos funcionais livres na superfície.

O cristal foi acoplado à bomba de seringa e à QCM utilizando uma célula microfluídica (FIGURA 3.3B) com capacidade para 150  $\mu\text{L}$  de solução. Inicialmente, a célula foi preenchida com PBS 7,4 e, em seguida, iniciou-se a medida de frequência de oscilação. Após estabilização da frequência, adicionou-se ao sistema à amostra e o fluxo foi desligado para incubação, aguardando a queda e a estabilização da frequência. Por fim, o fluxo foi ligado novamente para lavagem das espécies que não se ligaram ao peptídeo (FIGURA 3.3C).

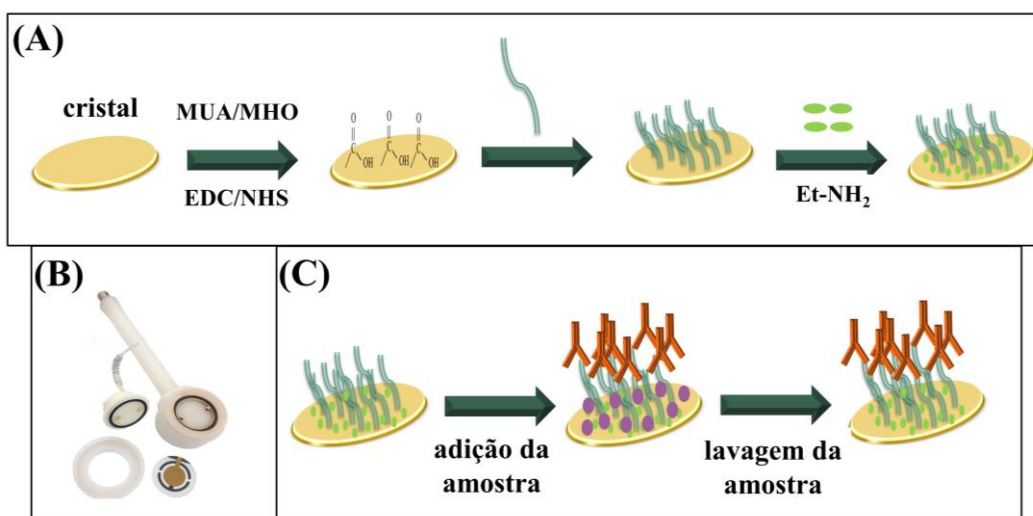


FIGURA 3.3 - (A) Imobilização do peptídeo na superfície do cristal de quartzo. (B) Célula microfluídica (150  $\mu$ L) utilizada para acoplar o cristal à QCM e à bomba. (C) Adição e lavagem da amostra à célula microfluídica.

Fonte: A autora.

## 3.2 – Resultados e discussão

### 3.2.1 – Estudo da robustez dos SPCEs

O estudo da robustez é requerido para a validação de um método, sendo exigência prévia para que ele possa ser aplicado em análises de rotina. O uso de planejamentos experimentais como o de Plackett-Burman são considerados eficientes para avaliar a robustez, constando em guias de validação de órgãos como o Eurachem<sup>175</sup>, a Associação Nacional de Autoridades de Teste da Austrália (*National Association of Testing Authorities, NATA*)<sup>176</sup> e, no Brasil, o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO)<sup>177</sup>.

Este estudo visou avaliar se pequenas alterações das condições padrão pode interferir nas análises eletroquímicas significativamente. Assim, os experimentos foram realizados em triplicata e a média da corrente de pico anódica ( $I_{pOx}$ ) foi avaliada. A matriz utilizada para gerar os dados e os resultados de corrente de pico média obtidos em cada experimento constam na TABELA 3.2.

TABELA 3.2 - Matriz do planejamento experimental saturado de Plackett-Burman para avaliação da robustez dos eletrodos descartáveis e resposta voltamétrica obtida

| Experimento | V1 | V2 | V3 | V4 | V5 | V6 | V7 | V8 | F9 | F10 | F11 | $I_p$ ( $\mu\text{A}$ ) média |
|-------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-------------------------------|
| 1           | 1  | -1 | 1  | -1 | -1 | -1 | 1  | 1  | 1  | -1  | 1   | 11,16                         |
| 2           | 1  | 1  | -1 | 1  | -1 | -1 | -1 | 1  | 1  | 1   | -1  | 11,18                         |
| 3           | -1 | 1  | 1  | -1 | 1  | -1 | -1 | -1 | 1  | 1   | 1   | 10,70                         |
| 4           | 1  | -1 | 1  | 1  | -1 | 1  | -1 | -1 | -1 | 1   | 1   | 11,74                         |
| 5           | 1  | 1  | -1 | 1  | 1  | -1 | 1  | -1 | -1 | -1  | 1   | 11,41                         |
| 6           | 1  | 1  | 1  | -1 | 1  | 1  | -1 | 1  | -1 | -1  | -1  | 11,61                         |
| 7           | -1 | 1  | 1  | 1  | -1 | 1  | 1  | -1 | 1  | -1  | -1  | 11,08                         |
| 8           | -1 | -1 | 1  | 1  | 1  | -1 | 1  | 1  | -1 | 1   | -1  | 11,28                         |
| 9           | -1 | -1 | -1 | 1  | 1  | 1  | -1 | 1  | 1  | -1  | 1   | 11,34                         |
| 10          | 1  | -1 | -1 | -1 | -1 | 1  | 1  | 1  | 1  | 1   | -1  | 11,33                         |
| 11          | -1 | 1  | -1 | -1 | -1 | 1  | 1  | 1  | -1 | 1   | 1   | 11,28                         |
| 12          | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1  | -1  | 11,55                         |

Fonte: A autora.

Com base nos resultados, é possível observar que há pouca variação da corrente de pico obtida, que apresentou média de todos os experimentos igual à 11,31  $\mu\text{A}$ . Os voltamogramas cíclicos referentes a cada experimento estão apresentados na FIGURA 3.4A. Observando o gráfico de probabilidade (FIGURA 3.4B), nota-se que mesmo as variáveis que apresentam maior significância têm efeitos muito pequenos na resposta (cerca de 0,4  $\mu\text{A}$ ), especialmente se considerarmos que o desvio padrão obtido para essas análises foi de 0,27  $\mu\text{A}$ . Assim, considera-se que a variação das condições experimentais não apresentou uma interferência significativa na resposta obtida, de modo que os efeitos podem ser considerados desprezíveis. Deste modo, é possível afirmar que os eletrodos são robustos frente à pequenas variações das suas condições de construção padrão.



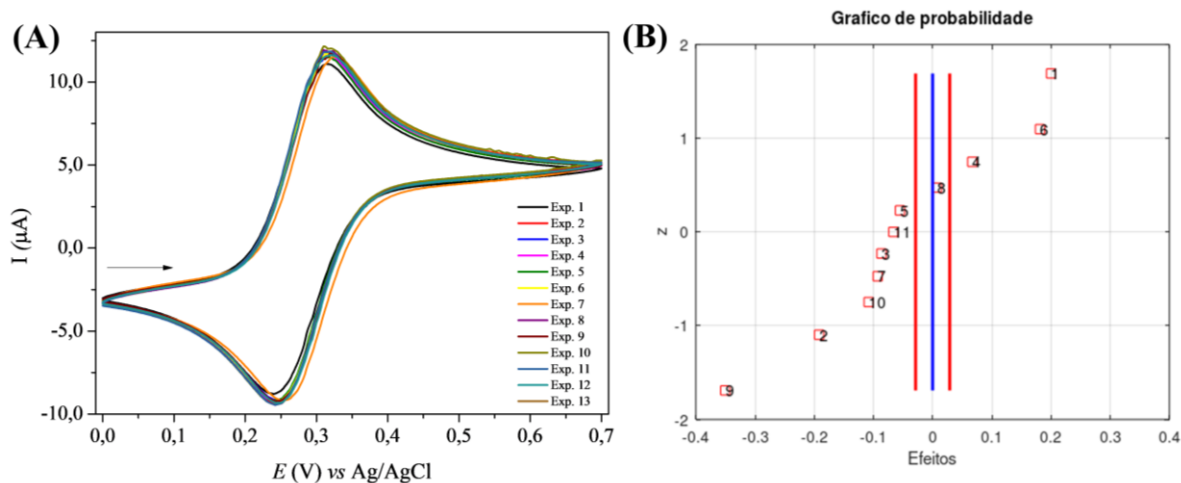


FIGURA 3.4 - (A) Voltamogramas cíclicos para os experimentos realizados no planejamento experimental. (B) Gráfico de probabilidade no intervalo de (A)  $-0,4$  a  $0,4 \mu\text{A}$ , gerado no *software* Octave.

Fonte: A autora.

### 3.2.2 – Estudo da estabilidade dos SPCEs

A estabilidade dos eletrodos foi avaliada em função do tempo, obtendo dados dos primeiros 70 dias e ao longo de 23 semanas após a fabricação dos eletrodos. Os dados foram obtidos em função dos valores de  $I_p$  e  $E_p$  dos processos de oxidação e de redução do FMA.

#### 3.2.2.1 – Estabilidade em 70 dias

Os resultados apresentados para os primeiros 70 dias constam na FIGURA 3.5 e na TABELA 3.3. Observa-se que até o dia 21 de análise a queda de  $I_p$  pode ser considerada desprezível (abaixo de 1%). Avaliando até o dia 39, a queda de sinal é maior, de modo que esse erro deve ser levado em conta nas análises. Do dia 01 ao dia 70, a queda de  $I_p$  é considerada significativa, apresentando taxa de queda próximo à 15%. Estes dados, entretanto, foram avaliados apenas comparando o primeiro dia com o dia em questão, de modo que ao avaliarmos a média de todos os dias analisados, observa-se DPRs de 8,69% para  $I_{pOx}$  (FIGURA 3.5A) e 8,09% para  $I_{pRed}$  (FIGURA 3.5B). Além disso, mesmo

com a queda do sinal, estes eletrodos apresentam resposta eletroquímica, podendo ser utilizados ao longo dos 70 dias. Deste modo, indica-se que dados que devem ser comparados sejam obtidos utilizando eletrodos com o mesmo tempo de prateleira, visando minimizar possíveis erros.

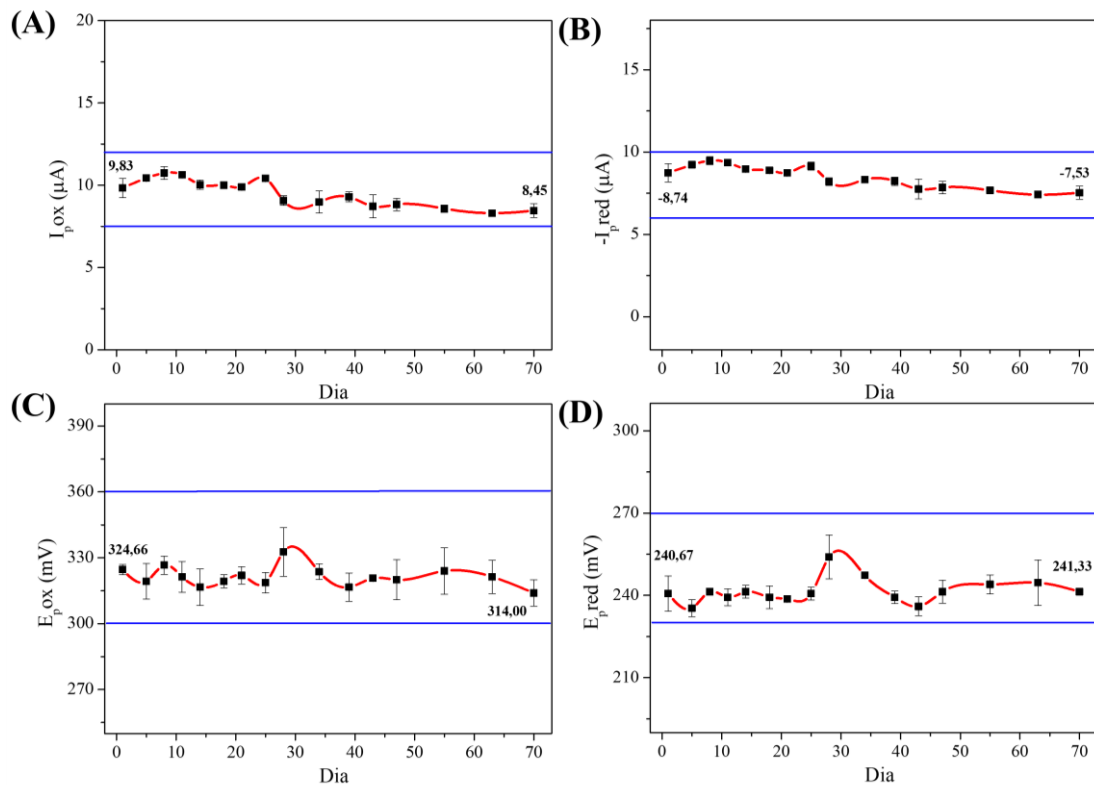


FIGURA 3.5 - Resultados do estudo de estabilidade ao longo de 70 dias após fabricação dos eletrodos. (A) Valores de  $I_{pOx}$ . (B) Valores de  $I_{pRed}$ . (C) Valores de  $E_{pOx}$ . (D) Valores de  $E_{pRed}$ .

Fonte: A autora.

Os valores de  $E_{pOx}$  (FIGURA 3.5C) e  $E_{pRed}$  (FIGURA 3.5D) referentes à estas mesmas análises não apresentaram alterações significativas durante os 70 dias, sem tendência de deslocamento de  $E_p$  para regiões mais positivas ou negativas. Observa-se que há uma variação entre as réplicas, que pode ser justificada pela fabricação manual dos eletrodos. Deste modo, é comum que estes eletrodos apresentem ligeira variação de  $E_p$  entre si, tanto entre réplicas avaliadas no mesmo dia quanto em dias diferentes.

TABELA 3.3 - Valores de obtidos no estudo de estabilidade ao longo de 70 dias

| Dias comparados | Resposta do dia           |                         | Taxa de queda (%)  |                |
|-----------------|---------------------------|-------------------------|--------------------|----------------|
|                 | inicial ( $\mu\text{A}$ ) | final ( $\mu\text{A}$ ) |                    |                |
| 01 e 21         | $I_{pOx}$                 | 9,83                    | 9,89               | 0,64           |
|                 | $I_{pRed}$                | -8,74                   | -8,73              | 0,09           |
| 01 e 39         | $I_{pOx}$                 | 9,83                    | 9,29               | 5,41           |
|                 | $I_{pRed}$                | -8,74                   | -8,23              | 5,82           |
| 01 e 70         | $I_{pOx}$                 | 9,83                    | 8,45               | 13,98          |
|                 | $I_{pRed}$                | -8,74                   | -7,53              | 13,83          |
| TODOS OS DIAS   |                           | <b>Média</b>            | <b>DP</b>          | <b>DPR (%)</b> |
|                 | $I_{pOx}$                 | 9,51 $\mu\text{A}$      | 0,83 $\mu\text{A}$ | 8,70           |
|                 | $I_{pRed}$                | -8,42 $\mu\text{A}$     | 0,68 $\mu\text{A}$ | -8,09          |
|                 | $E_{pOx}$                 | 321,35 mV               | 4,44 mV            | 1,38           |
|                 | $E_{pRed}$                | 241,54 mV               | 4,46 mV            | 1,84           |

Fonte: A autora.

### 3.2.2.2 – Estabilidade em 23 semanas

Os eletrodos foram avaliados durante 23 semanas, totalizando 173 dias, e os resultados podem ser observados na FIGURA 3.6 e na TABELA 3.4. É possível observar que, a partir da semana 7, há queda no sinal de  $I_p$  tanto para oxidação quanto para redução. Isso indica diminuição da condutividade do eletrodo, com queda de  $I_p$  significativa. Comparando os valores de  $I_p$  das semanas 1 e 15, observa-se que o sinal continua caindo, desta vez apresentando queda de cerca de 30% do valor obtido inicialmente. Por fim, ao comparar a semana 1 e a 23, a queda é de mais de 50% do sinal inicial, indicando que a superfície eletródica continuou perdendo atividade condutora. Ademais, observa-se DPRs de 24,02% para  $I_{pOx}$  (FIGURA 3.6A) e 24,28% para  $I_{pRed}$  (FIGURA 3.6B), sendo considerado significativa a diferença entre os eletrodos de um mesmo lote avaliados em semanas diferentes.

Os valores de  $E_p$  (oxidação e redução, respectivamente FIGURA 3.6C e 3.6D) apresentaram a mesma tendência dos primeiros 70 dias, com

variações pouco significativas durante 23 semanas. Isso indica que não houve alterações no eletrodo de referência de Ag/AgCl com o tempo.

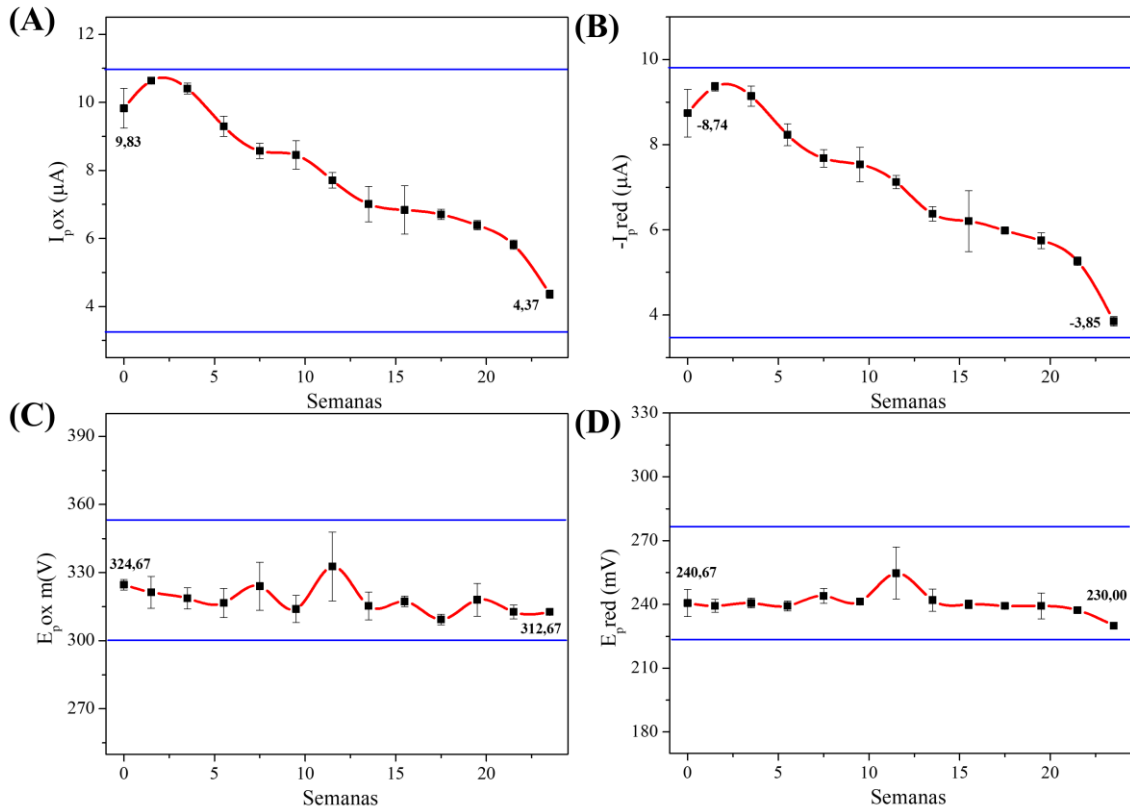


FIGURA 3.6 - Resultados do estudo de estabilidade ao longo de 23 semanas após fabricação dos eletrodos. (A) Valores de  $I_{pOx}$ . (B) Valores de  $I_{pRed}$ . (C) Valores de  $E_{pOx}$ . (D) Valores de  $E_{pRed}$ .

Fonte: A autora.

TABELA 3.4 - Valores de obtidos no estudo de estabilidade ao longo de 23 semanas

| Semanas comparadas |            | Resposta da semana inicial ( $\mu\text{A}$ ) | Resposta da semana final ( $\mu\text{A}$ ) | Taxa de queda (%) |
|--------------------|------------|--|--|-------------------|
| 01 e 07            | $I_{pOx}$  | 9,83   | 8,57                                       | 12,75             |
|                    | $I_{pRed}$ | -8,74  | -7,68                                      | 12,14             |
| 01 e 15            | $I_{pOx}$  | 9,83   | 6,84                                       | 30,42             |
|                    | $I_{pRed}$ | -8,74  | -6,20                                      | 29,03             |
| 01 e 23            | $I_{pOx}$  | 9,83   | 4,37                                       | 55,57             |
|                    | $I_{pRed}$ | -8,74  | -3,85                                      | 55,95             |
| TODOS OS DIAS      |            | <b>Média</b>                                 | <b>DP</b>                                  | <b>DPR (%)</b>    |
|                    | $I_{pOx}$  | 7,85 $\mu\text{A}$                           | 1,89 $\mu\text{A}$                         | 24,02             |
|                    | $I_{pRed}$ | -7,02 $\mu\text{A}$                          | 1,63 $\mu\text{A}$                         | 23,28             |
|                    | $E_{pOx}$  | 318,26 mV                                    | 6,22 mV                                    | 1,95              |
|                    | $E_{pRed}$ | 240,62 mV                                    | 5,34 mV                                    | 2,22              |

Fonte: A autora.

Ressalta-se que os eletrodos apresentam variações de  $I_p$  e  $E_p$  entre si, mesmo as réplicas analisadas no mesmo dia. Isso ocorre devido ao seu processo de fabricação manual, que apresenta um erro aleatório maior do que de eletrodos fabricados em sistemas automatizados.

### 3.2.3 – Avaliação da reatividade dos peptídeos

A avaliação da especificidade da interação entre os peptídeos e anticorpos específicos anti-*M. leprae* foi realizada utilizando QCM e os resultados podem ser observados na FIGURA 3.7.

Inicialmente, o peptídeo foi imobilizado no cristal de quartzo e este foi inserido em uma célula com fluxo de PBS pH 7,4. Aguardou-se até a estabilização da frequência e uma amostra de soro (diluição 1:50) foi adicionada ao sistema. Nesta etapa, foi realizada incubação com fluxo de solução desligado. Uma queda de frequência ressoante pode ser observada, indicando uma variação de massa sobre a superfície do cristal. Novamente, aguardou-se até a estabilização

da frequência, indicando que não havia mais massa sendo adicionada à superfície do sensor. Então, o fluxo de PBS foi religado para lavagem das espécies que não se ligaram ao peptídeo. Durante a lavagem, a frequência ressoante tem novo aumento, indicando que a massa sobre o cristal diminuiu devido a retirada das espécies que não se ligaram ao peptídeo. Ao final deste processo (quando há nova estabilização de frequência), foi observado a variação ( $-\Delta f$ ) entre a frequência inicial (no momento da adição do soro) e final (após lavagem).

Observa-se que os valores de  $-\Delta f$  obtidos são maiores para a amostra hanseniana do que para a amostra saudável, para ambos os peptídeos. Para o peptídeo APDDPAWQNIFNLRR (FIGURA 3.7A e 3.7B),  $-\Delta f$  de amostra saudável foi igual à 5,92 Hz, enquanto da amostra hanseaniana foi de 30,31 Hz. Já para o peptídeo SGLSQVTGLFGVPGL (FIGURA 3.7C e 3.7D),  $-\Delta f$  de amostra saudável foi igual à 5,00 Hz e da amostra hanseaniana foi de 30,64 Hz. Um valor de  $-\Delta f$  maior indica que mais espécies (neste caso, anticorpos anti-*M. leprae*) ligaram-se ao peptídeo, confirmando a seletividade do mesmo para detecção de anticorpos específicos em pacientes hansenianos.

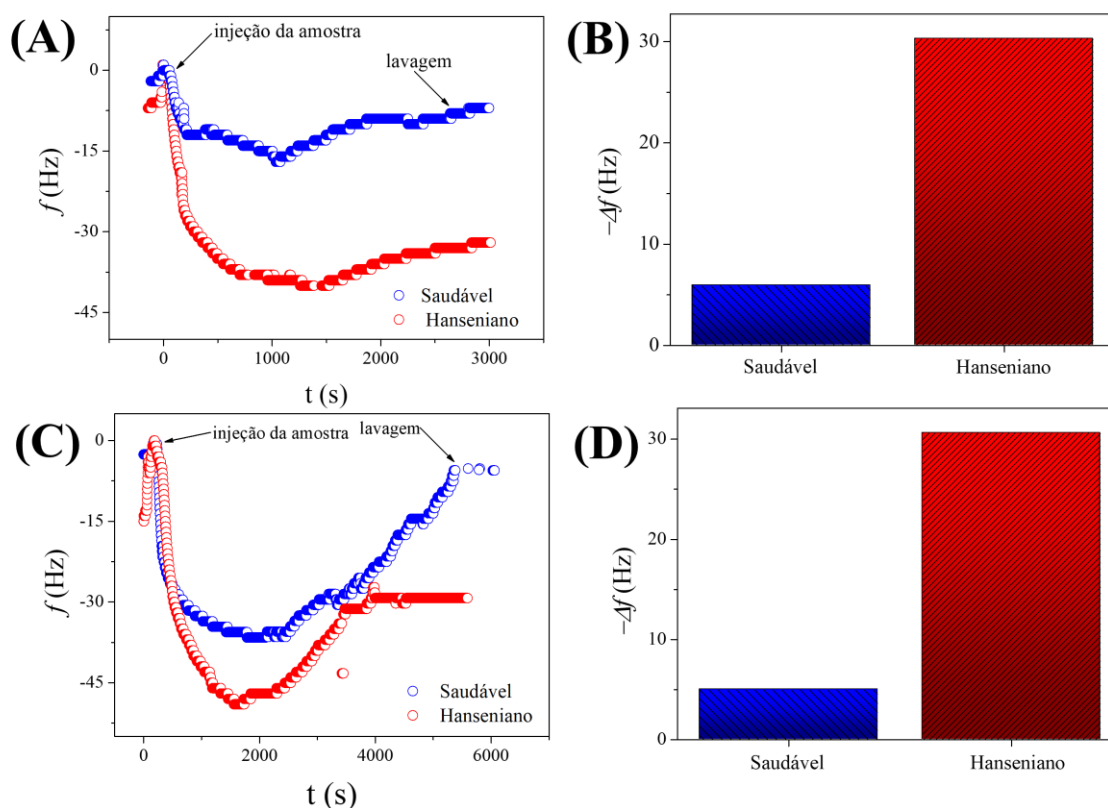


FIGURA 3.7 - Estudo da reatividade dos peptídeos frente à amostra de soro (●) saudável e (●) hanseniana (MB). (A) Frequência ressonante em função do tempo e (B) gráfico de barras para a variação de frequência ( $-\Delta f$ ) obtidos para o peptídeo APDDPAWQNIFNLRR. (C) Frequência ressonante em função do tempo e (D) gráfico de barras para a variação de frequência ( $-\Delta f$ ) obtidos para o peptídeo SGLSQVTGLFGVPGL.

Fonte: A autora.

Ademais, foi realizado um experimento na QCM com uma sequência peptídica não específica para hanseníase (FIGURA 3.8). Esta sequência, usada para detecção da proteína spike do SARS-CoV-2, não apresentou diferença de  $-\Delta f$  significativa para amostras positivas (45,69) e negativas (57,08) para hanseníase. Deste modo, pode-se afirmar que este peptídeo não é adequado para a detecção de anti-*M. leprae*, enquanto os anteriores podem ser utilizados para diferenciar amostras positivas e negativas para a doença.

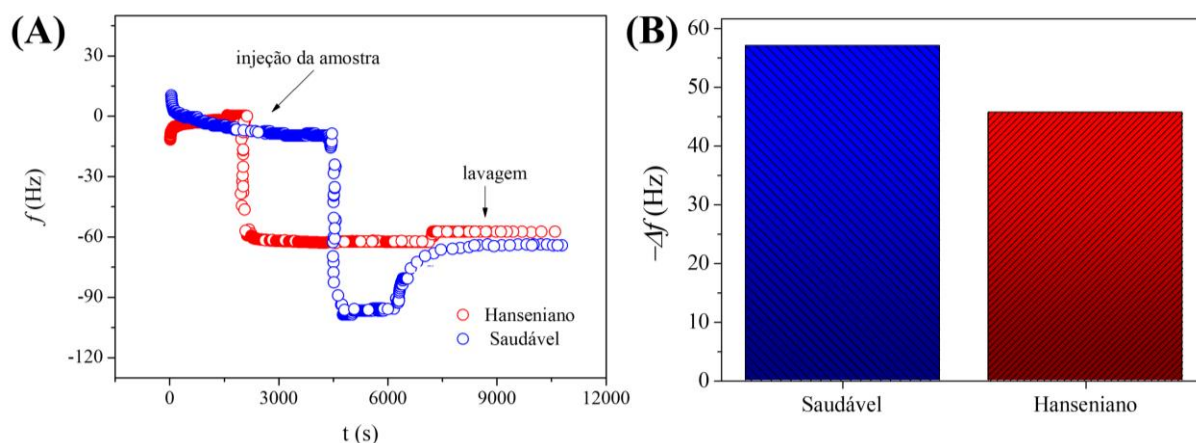


FIGURA 3.8 - Estudo da reatividade do peptídeo  ${}_{24}\text{QAKTFLDKFNHEAEDLFYQ}_{42}\text{C}$  (controle negativo) frente à amostra de soro (●) saudável e (●) hanseniana (MB). (A) Frequência ressonante em função do tempo e (B) gráfico de barras para a variação de frequência ( $-\Delta f$ ).

Fonte: A autora.

### 3.3 – Considerações parciais

Os eletrodos SPCEs foram construídos por meio da técnica de serigrafia. A metodologia de construção destes sensores pode ser considerada robusta, uma vez que apresentou baixa suscetibilidade à variações de sinal de  $I_p$  ao variar ligeiramente as condições padrão.

Além disso, os eletrodos apresentaram boa estabilidade com o decorrer de 70 dias, uma vez que foi obtida uma variação pequena entre os valores de  $I_p$  ao longo do tempo. No decorrer de 23 semanas, observou-se queda no sinal de  $I_p$  a partir da semana 7, indicando perda de condutividade do eletrodo.

Ademais, os valores de  $E_p$  não variaram significativamente com o tempo, indicando que o eletrodo de referência de Ag/AgCl apresenta boa estabilidade, não levando a deslocamento de potencial para regiões mais positivas ou negativas.

Os peptídeos APDDPAWQNIFNLRR e SGLSQVTGLFGVPGL apresentaram boa reatividade para o anticorpo anti-*M. leprae*, com diferença significativa entre amostra positiva e negativa para hanseníase. O peptídeo  ${}_{24}\text{QAKTFLDKFNHEAEDLFYQ}_{42}\text{C}$ , não específico para hanseníase, foi avaliado



como controle negativo e não diferenciou a amostra positiva da negativa. Deste modo, pode-se concluir que os peptídeos APDDPAWQNIFNLRR e SGLSQVTGLFGVPGL são adequados para a detecção de anti-*M. leprae*, podendo ser utilizados para diferenciar amostras de indivíduos com hanseníase dos sem a doença.



***DESENVOLVIMENTO  
DE IMUNOENSAIO PARA  
DETECÇÃO DE ANTI-M.  
LEPRAE UTILIZANDO O  
PEPTÍDEO  
APDDPAWQNIFNLRR***

***Capítulo 4***

## 4 - DESENVOLVIMENTO DE IMUNOENSAIO PARA DETECÇÃO DE ANTI-*M. LEPRAE* UTILIZANDO O PEPTÍDEO APDDPAWQNIFNLRR

### 4.1 – Procedimento experimental

#### 4.1.1 – Reagentes e soluções

Ácido 2-(N-morfolino) etanossulfônico monohidratado (MES,  $\geq 99,5\%$ ), polisorbato 20 (Tween 20), hidroquinona (HQ,  $\geq 99\%$ ) e soro fetal bovino foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). As partículas magnéticas funcionalizadas com grupos carboxilas (suspensão com concentração  $10 \text{ mg mL}^{-1}$  e diâmetro médio de  $1,0 \mu\text{m}$ ) foram obtidas da Invitrogen (Dynabeads<sup>®</sup> MyOne<sup>™</sup> Carboxylic Acid, código 65012, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Os anticorpos humanos IgG marcados com a enzima *horseradish peroxidase* (HRP) (produzido em cabra, código ab97165) foram obtidos da Abcam (Cambridge, MA, USA).

PBS-Tween 20, utilizado entre as etapas do imunoensaio para lavagem, foi preparado em concentração de  $0,05\%$  (m/v) e mantido à  $4^\circ\text{C}$  até o uso.

O anticorpo secundário marcado com a enzima HRP (IgG/HRP)  $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  foi preparado em PBS pH 6,5 imediatamente antes do uso. Da mesma forma, a solução mista de HQ  $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$   $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  foi preparada antes do uso em PBS pH 6,5 desairada com  $\text{N}_2$  por 30 minutos antes do preparo.

Os demais reagentes e soluções utilizados foram descritos no capítulo anterior (item 3.1.1).

#### 4.1.2 – Instrumentação e materiais

O cartão adesivo dupla-face, usado para a montagem do dispositivo microfluídico descartável, foi obtido no comércio local de São Carlos (SP). O corte do canal microfluídico neste cartão foi realizado em um *plotter* de recorte (A3 *cutting plotter*, F1 Suprimentos, Brasil).

Utilizou-se um espectrofotômetro UV-Vis (Shimadzu UV-2450) e uma cubeta de quartzo com 10 mm de caminho óptico para avaliar a eficiência da conjugação pep/PM.

Os demais instrumentos e materiais utilizados encontram-se descritos no capítulo anterior (item 3.1.2).

#### *4.1.3 – Montagem do dispositivo microfluídico descartável*

Para a detecção eletroquímica, utilizou-se um dispositivo microfluídico descartável composto por um arranjo com 8 eletrodos de trabalho (3,0 mm de diâmetro superficial, com 1,0 mm de distância entre eletrodos) e um arranjo com um eletrodo de referência (30 x 1,5 mm) e um eletrodo auxiliar (28 x 1,8 mm).

O canal microfluídico (dimensões: 35 x 4,0 x 0,4 mm; volume interno: 56 µL) foi cortado em um cartão adesivo dupla face de poliestireno utilizando um *plotter* de recorte. De um lado do adesivo foi colado o arranjo de eletrodos de trabalho e do outro foi colado o arranjo com eletrodo auxiliar e eletrodo de referência, fechando assim o sistema. Este processo contou com o auxílio de uma prensa térmica (120 °C, 200 s), visando uma maior eficiência de colagem para evitar vazamentos de solução. Deste modo, as áreas superficiais dos eletrodos foram posicionadas na parte interna do dispositivo, delimitado pelo cartão adesivo. Ademais, nas extremidades do arranjo de eletrodos auxiliar e de referência, foram abertos dois orifícios para entrada e saída de solução do canal. O esquema do dispositivo pronto para uso está representado na FIGURA 4.1, juntamente com uma foto real.

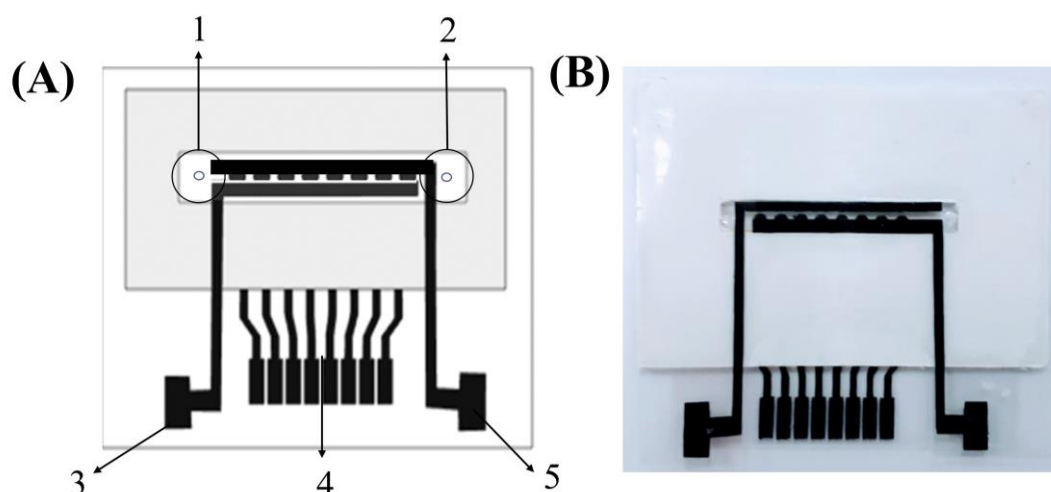


FIGURA 4.1 - (A) Esquema do dispositivo microfluídico utilizado neste estudo, com seus componentes: 1) orifícios para entrada e 2) para saída de solução; 3) eletrodo auxiliar; 4) arranjo de eletrodos de trabalho (8 eletrodos); e 5) eletrodo de referência (Ag/AgCl voltado para dentro do canal microfluídico). (B) Foto real do dispositivo pronto para uso.

Fonte: A autora.

#### 4.1.4 – Sistema microfluídico com detecção eletroquímica

Como pode ser observado na FIGURA 4.2, o sistema microfluídico consistiu em uma bomba de seringa (1) e uma válvula manual de injeção (2), conectados ao dispositivo construído (3). A bomba de seringa, responsável pelo controle do fluxo de solução no dispositivo microfluídico, fica acoplada à entrada da célula eletroquímica por meio de um conector PEEK, fixado com fita adesiva dupla-face. A solução carreadora (seringa) passa pelo canal constantemente<sup>160,178</sup>. O dispositivo também é conectado ao multipotenciostato DropSens (ustat8000) (4), que é acoplado à um computador pessoal (5). Para as análises, foi utilizada a técnica de amperometria (*software* Drop View 8400). Assim que ocorreu a estabilização da corrente amperométrica, foi injetada a solução de detecção, gerando assim o sinal de corrente de pico transiente (6).

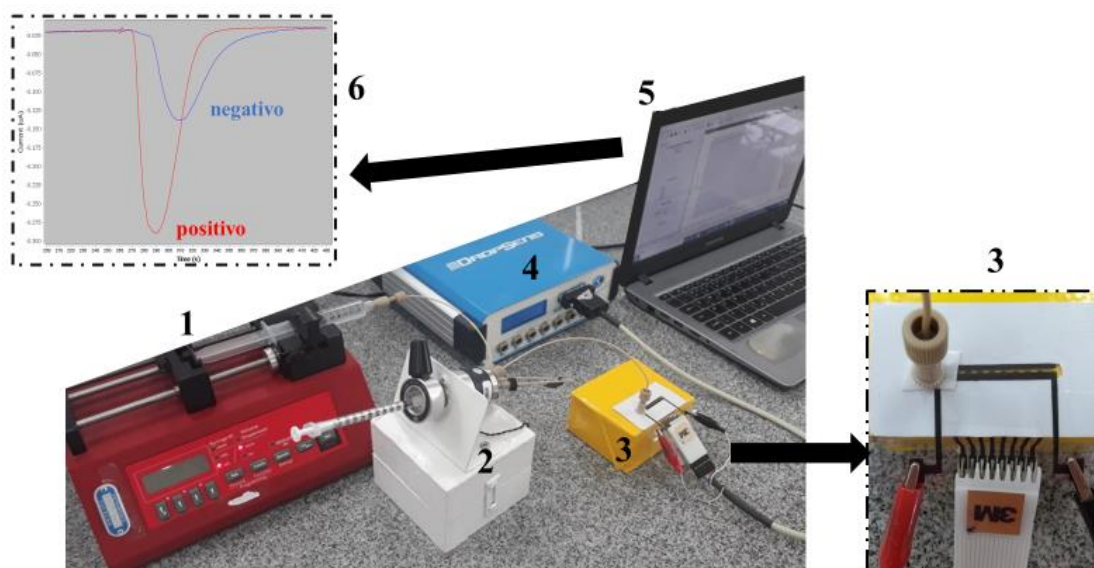


FIGURA 4.2 - Sistema microfluídico e seus componentes: (1) bomba de seringa; (2) válvula injetora; (3) dispositivo microfluídico descartável; (4) multipotenciostato; (5) computador pessoal; (6) resultado de corrente transiente gerado.

Fonte: A autora.

O potencial fixo aplicado para a detecção foi de  $-0,2 \text{ V}^{155,162}$ , durante um tempo de 2000 segundos. Utilizou-se PBS pH 6,5 como solução carreadora, uma alça de amostragem de  $50 \mu\text{L}$  e vazão de  $100 \mu\text{L min}^{-1}$  para a injeção da solução de detecção. Esta é uma solução mista contendo  $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$  de HQ e  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , e a detecção ocorre com base no ciclo catalítico da enzima HRP (marcador eletroquímico; FIGURA 4.3). Na presença de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e do catalisador HRP, a HQ é oxidada a p-benzoquinona (BQ) que, em potencial  $-0,2 \text{ V}$ , é reduzida novamente a HQ na superfície do eletrodo em um processo que envolve dois elétrons e dois prótons, gerando assim o sinal analítico<sup>179,180</sup>.

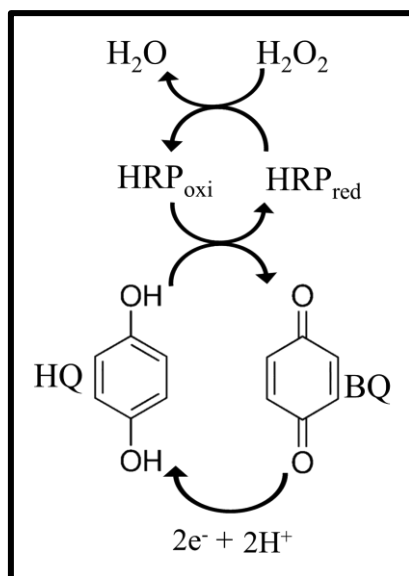


FIGURA 4.3 - Ciclo catalítico da enzima HRP.

Fonte: Adaptado de Castro *et. al*<sup>180</sup>.

#### 4.1.5 – Ancoragem do peptídeo à PM

A ancoragem dos peptídeos às PMs foi realizada de acordo com o protocolo do fabricante<sup>181</sup>, visando assegurar uma pré-concentração, com a captura seletiva do anticorpo, e amplificação do sinal analítico<sup>182</sup>. O processo pode ser conferido esquematicamente na FIGURA 4.4.

Inicialmente, foi realizada lavagem das PMs com tampão MES 50 mmol L<sup>-1</sup> pH 5,2. Em seguida, a ativação dos grupos carboxílicos na superfície das PMs foi feita utilizando EDC (0,4 mol L<sup>-1</sup>) / NHS (0,1 mol L<sup>-1</sup>) por 30 minutos sob agitação leve em um misturador rotativo. Etapas de lavagem (3x) foram realizadas novamente com tampão MES 50 mmol L<sup>-1</sup> pH 5,2 com auxílio da estante magnética. O peptídeo sintético foi então adicionado às PMs, sob agitação leve por 24h. Após, etapas de lavagem (3x) utilizaram solução PBS-Tween 20 0,05% (m/v) para retirada de peptídeos não ancorados às PMs. Por fim, foi realizado o bloqueio dos sítios de ligação não específicos utilizando 1,0 mol L<sup>-1</sup> de etanolamina pH 8,0 durante 60 minutos, seguida de lavagem com PBS-Tween 20 0,05% (m/v). O bioconjugado pep/PM foi suspenso em 500 µL de PBS-Tween 20 0,05% (m/v) e armazenado a 4°C para uso em até 21 dias.



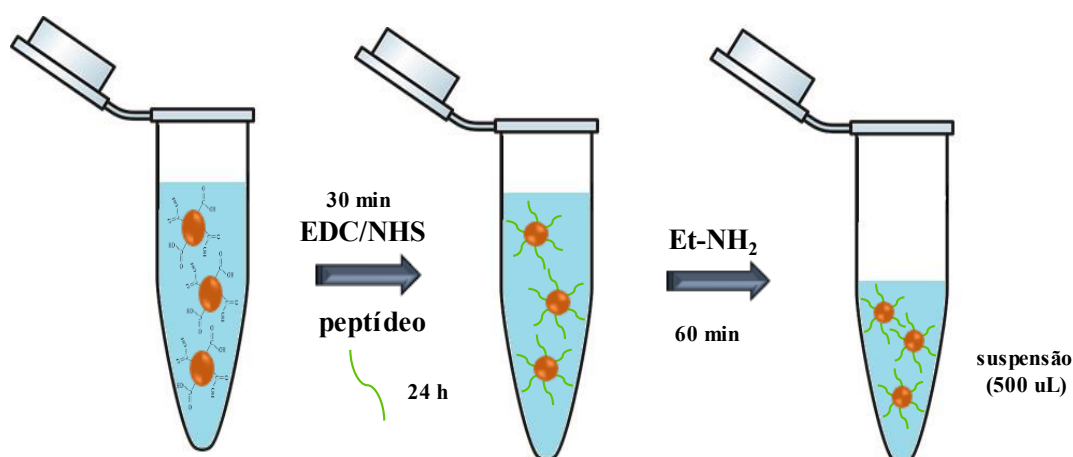


FIGURA 4.4 - Ativação das PMs com EDC/NHS e adição de peptídeo às PMs, formando o conjugado pep/PM; Bloqueio dos sítios não específicos de ligação com etanolamina.

Fonte: A autora.

#### 4.1.6 – Eficiência da ancoragem do peptídeo à PM

A eficiência da ancoragem do peptídeo às PMs (ou seja, qual a concentração de peptídeo que foi conjugada à PM) foi avaliada por espectroscopia UV-Vis. Para isso, inicialmente foram obtidos espectros de absorção para diferentes concentrações do peptídeo, construindo uma curva analítica. Em seguida, foi obtido espectro de absorção referente às lavagens pós imobilização (antes da adição de etanolamina para bloqueio). Sabendo a concentração presente nesta solução, foi possível calcular a concentração de peptídeos ancorados às PMs de acordo com a EQUAÇÃO 4.1.

$$C_{\text{peptídeo na PM}} = C_{\text{adicionada}} - C_{\text{lavagens}} \quad (\text{EQUAÇÃO 4.1})$$

#### 4.1.7 – Captura de anti-*M. leprae* em amostras de soro

A captura dos anticorpos específicos de hanseníase foi realizada adicionando o conjugado pep/PM à amostra de soro diluída (1:50 v/v) em PBS 7,4 e mantendo sob agitação leve durante 30 minutos. Após, adicionou-se uma

solução de  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  IgG/HRP, também sendo mantida em agitação leve por 1h. Entre cada etapa, foi realizada separação magnética e lavagem com PBS-Tween 20 0,05% (m/v). Finalmente, o bioconjugado HRP/IgG/Ac/pep/PM foi suspenso em  $60 \mu\text{L}$  de PBS-Tween 20 0,05% (m/v). Este processo está representado na FIGURA 4.5.

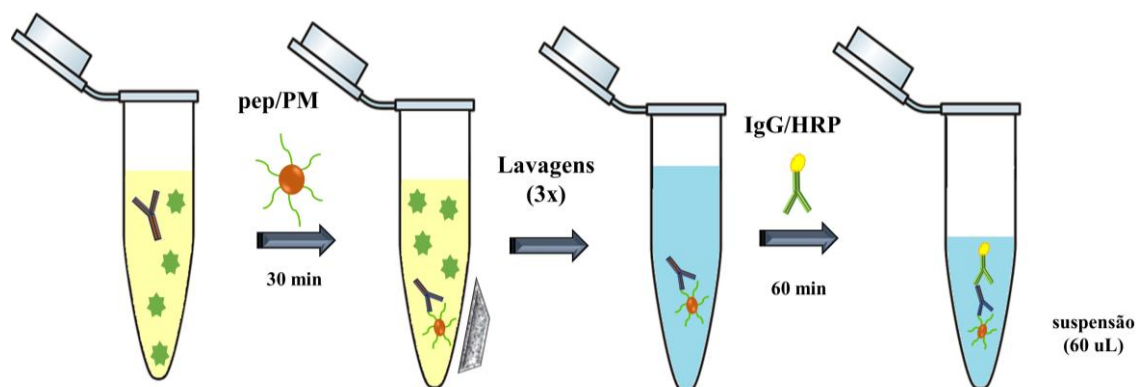


FIGURA 4.5 - Adição de pep/PM à amostra contendo anticorpos anti *M. leprae*; Separação magnética do bioconjugado Ac/pep/PM para lavagem e eliminação dos demais interferentes da amostra; Adição de HRP/IgG; Separação magnética do bioconjugado HRP/IgG/Ac/pep/PM para lavagem e eliminação de partículas em excesso.

Fonte: A autora.

A adição deste bioconjugado sobre os eletrodos de trabalho foi realizado utilizando uma micropipeta automática. Abaixo dos eletrodos de trabalho, foi posicionado um ímã para atrair as PMs presentes no bioconjugado. Assim, foram aplicados  $3 \mu\text{L}$  de HRP/IgG/Ac/pep/PM e, após 10 segundos, o excesso de solução foi retirado também com a micropipeta, deixando apenas o bioconjugado na superfície eletródica.

#### 4.1.8 – Otimização do conjugado pep/PM no ensaio

Para encontrar a melhor condição experimental do bioconjugado pep/PM, foi realizado um planejamento fatorial  $2^2$  completo com triplicata do ponto central. Este planejamento avaliou diferentes concentrações de peptídeo

ancorado na PM e diferentes volumes do conjugado pep/PM no ensaio. Desta forma, foram realizados cinco experimentos distintos, apresentados na TABELA 4.1. Nestes experimentos, foram utilizados os valores de  $\Delta F$  (%) referentes à relação entre a resposta amperométrica de uma amostra MB e uma amostra de branco (soro fetal bovino). Mantiveram-se fixas as concentrações de HQ ( $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ), bem como a concentração de HRP/IgG humana ( $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

TABELA 4.1 - Planejamento fatorial para otimização das partículas magnéticas

| Experimento | C <sub>peptídeo</sub> |                                | V <sub>PM/pep</sub> |                        |
|-------------|-----------------------|--------------------------------|---------------------|------------------------|
|             | Codificado            | Real ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) | Codificado          | Real ( $\mu\text{L}$ ) |
| 1           | -1                    | 10                             | 1                   | 50                     |
| 2           | 1                     | 50                             | -1                  | 10                     |
| 3           | 0                     | 30                             | 0                   | 30                     |
| 4           | 1                     | 50                             | 1                   | 50                     |
| 5           | -1                    | 10                             | -1                  | 10                     |

Fonte: A autora.

Com base nos resultados obtidos para cada experimento, foi calculado um modelo de regressão linear, utilizando o *software* livre Octave, na versão *Guide user interface* (GUI), com a rotina computacional “*regression2*”<sup>174</sup>. Empregando a EQUAÇÃO 4.2, cujos termos derivam do modelo de regressão, foram então desenhados gráficos de contorno e superfície de resposta utilizando um *template* fornecido por Pereira e Pereira-Filho (2018)<sup>174</sup> no *software* Excel, de modo a verificar a região de máxima desejabilidade.

$$y = b_0 + b_1 v_1 + b_2 v_2 + b_{12} v_1 v_2 \quad (\text{EQUAÇÃO 4.2})$$

Sendo  $y$  é a resposta,  $b_0$  é o coeficiente constante que estima o valor médio populacional de todas as respostas,  $b_1$  e  $b_2$  são os coeficientes lineares dos efeitos principais e  $b_{12}$  corresponde às variáveis e suas interações, obtidos a partir

do modelo de regressão<sup>171</sup>. Adicionalmente, foram calculados os efeitos de cada uma das variáveis, bem como a interação entre elas.

#### *4.1.9 – Curva de diluição da amostra*

O desempenho analítico do imunossensor foi avaliado pela construção de uma curva de diluição de amostra com 5 pontos: 1:400 (mais diluída), 1:350, 1:250, 1:100 e 1:50 (menos diluída). Embora, devido à falta de anticorpos anti-*M. leprae* padrão, não seja possível calcular limites de detecção e quantificação, este estudo foi realizado com o intuito de obter a melhor diluição da amostra pra estudos posteriores.

A linearidade do sistema foi avaliada pela aplicação da técnica de regressão linear e de um teste de falta de ajuste no nível de 95% de confiança, bem como pelos valores de  $r$  (coeficiente de correlação) e  $R^2$  (coeficiente de determinação). Também, foi avaliada a significância dos coeficientes angular e linear na equação da reta. Os resultados estatísticos foram obtidos com o uso do *software* computacional Minitab for Windows 18.1 (*Minitab, Minitab Incorporation, USA, 2010*).

#### *4.1.10 – Precisão do imunoensaio*

A precisão do imunoensaio foi avaliada de três maneiras: análise de 5 réplicas de um arranjo; análise de 5 réplicas de 3 dispositivos construídos no mesmo dia; e análise de 5 réplicas de 3 dispositivos, cada um construído em um dia diferente. Os resultados foram expressos em termos de DPR (%), conforme a EQUAÇÃO 3.2.

#### 4.1.11 – Desempenho do imunoensaio para diagnóstico sorológico de hanseníase

O imunoensaio foi aplicado em 49 amostras de soro de pacientes com hanseníase e indivíduos saudios. As amostras foram divididas conforme prontuário médico – ou seja, de acordo com exame clínico e, em alguns casos, baciloscopia. Os indivíduos foram divididos de acordo com o prontuário médico em 3 coortes: 1) indivíduos não hansenianos (controles saudáveis), 2) pacientes PB e 3) pacientes MB. As amostras de indivíduos controle foram fornecidas pelo Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná (Hemepar) de Curitiba. Já as amostras de pacientes hansenianos são provenientes do estado do Mato Grosso (Terra Nova do Norte, Matupá, Novo Mundo, Marcelândia, Guarantã do Norte, Peixoto Azevedo e Colider), a área mais endêmica do Brasil.

A análise utilizou um dispositivo para cada amostra. Os resultados obtidos foram normalizados utilizando a EQUAÇÃO 4.3<sup>183</sup>, de modo a minimizar variações entre valores de corrente transiente obtidos com diferentes lotes de PMs.

$$\Delta F(\%) = \frac{(I_{amostra} - I_{branco})}{I_{branco}} \times 100 \quad (EQUAÇÃO 4.3)$$

Por fim, uma curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) foi construída para avaliar a qualidade do diagnóstico clínico fornecido pelo imunossensor desenvolvido. Essa análise teve por objetivo a avaliação concomitante da sensibilidade (verdadeiros positivos, EQUAÇÃO 4.4) e da especificidade (verdadeiros negativos, EQUAÇÃO 4.5), fixando um valor de corte (*cut off*) que separa os indivíduos conforme o diagnóstico (verdadeiros positivos, falsos positivos, verdadeiros negativos e falsos negativos)<sup>184</sup>.

$$Sensibilidade (100\%) = \frac{(Verdadeiro\ positivos)}{(Falsos\ negativos + Falsos\ Positivos)} \quad (EQUAÇÃO 4.4.)$$

$$100 - \text{Especificidade}(\%) = \frac{(\text{Falsos positivos})}{(\text{Verdadeiros negativos} + \text{Falsos Positivos})}$$

(EQUAÇÃO 4.5)

## 4.2 – Resultados e discussão

### 4.2.1 – Eficiência da ancoragem do peptídeo à PM

Utilizando espectroscopia UV-Vis, foi avaliada a concentração de peptídeos conjugada às PMs. Para tal, inicialmente foi construída uma curva analítica com as seguintes concentrações de peptídeo em PBS pH 7,4: 2,76; 0,55; 0,27; 0,14 e 0,069  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Os espectros podem ser observados na FIGURA 4.6A. Nota-se uma banda em 220 nm, característico da ligação C=O dos peptídeos, proporcional ao aumento de concentração. Esta banda sofre deslocamento de comprimento de onda ( $\lambda$ ) a partir de 0,27  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , característico de baixas concentrações. Ademais, é possível notar outra banda menor em torno de 280 nm, que pode ser atribuída às cadeias laterais dos aminoácidos com anéis aromáticos ou agrupamentos amina<sup>155,185</sup>.

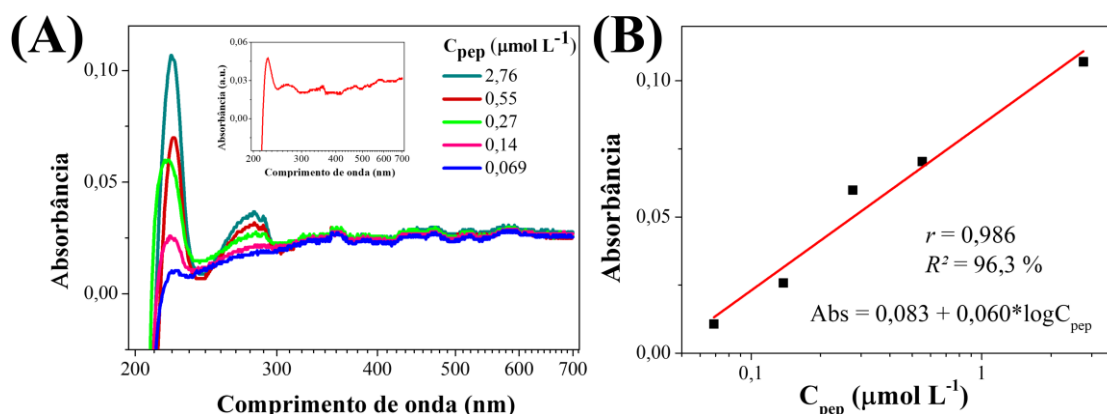


FIGURA 4.6 - (A) Espectros de absorção UV-Vis em diferentes concentrações do peptídeo: (●) 0,069; (●) 0,14; (●) 0,27; (●) 0,55; (●) 2,76  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Inserido: espectro de absorção UV-Vis da lavagem. (B) Curva analítica do peptídeo obtida por UV-Vis.

Fonte: A autora.

Com os valores de absorvância para 220 nm (indicado pelo fabricante do peptídeo), uma curva analítica foi construída (FIGURA 4.6B). O coeficiente de correlação obtido foi de 0,986 e o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foi 96,3%, indicando a linearidade do sistema. Obteve-se, também, a equação da reta, representada pela EQUAÇÃO 4.6, sendo  $C_{pep}$  a concentração do peptídeo e  $Abs$  a absorvância.

$$Abs = 0,083 + 0,060 * \log C_{pep} \quad (EQUAÇÃO 4.6)$$

Para a quantificação do peptídeo na PM, foi avaliado o sobrenadante das lavagens realizadas após a imobilização da biomolécula. O espectro obtido está inserido na FIGURA 4.6A, tendo uma absorvância de 0,0438 em 220 nm. Com base na EQUAÇÃO 4.6, foi possível calcular a quantidade de peptídeo presente nas lavagens ( $7,41 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). Consequentemente, a concentração de peptídeo na PM deve ser igual à diferença entre a concentração total adicionada no início do procedimento ( $27,6 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e a obtida para a lavagem. Deste modo, estima-se que  $20,2 \mu\text{mol L}^{-1}$  de peptídeo esteja ancorada às PMs, um valor equivalente à 73,14% do adicionado inicialmente.

#### 4.2.2 – Otimização do conjugado pep/PM no ensaio

Com base nos experimentos realizados, foi calculado um modelo de regressão linear, de modo a apresentar qual a condição de trabalho ideal. Para tal, foram utilizados os valores de  $\Delta F$  (%) referentes à relação entre a resposta amperométrica de uma amostra MB e uma amostra de branco. Este modelo de regressão considerou os efeitos sem interação entre os componentes, bem como os efeitos de interação binária entre todos os pares de componentes. Os resultados obtidos em cada experimento constam na TABELA 4.2.

TABELA 4.2 - Planejamento fatorial para otimização das partículas magnéticas e resposta de  $\Delta F$  (%) obtida

| Experimento | C <sub>peptídeo</sub> | V <sub>pep/PM</sub> | Resposta ( $\Delta F$ (%)) |
|-------------|-----------------------|---------------------|----------------------------|
| 1           | -1                    | 1                   | 107,5115                   |
| 2           | 1                     | -1                  | 80,61612                   |
| 3           | 0                     | 0                   | 107,7773                   |
| 3           | 0                     | 0                   | 105,5417                   |
| 3           | 0                     | 0                   | 113,0296                   |
| 4           | 1                     | 1                   | 185,1206                   |
| 5           | -1                    | -1                  | 9,507587                   |

Fonte: A autora.

A partir da triplicata do ponto central (experimento 3) e da EQUAÇÃO 4.6, foi calculada uma soma quadrática do erro puro (SQEP) igual à 29,55114 com 2 graus de liberdade.

$$SQEP = \frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n-1} \quad (EQUAÇÃO 4.6)$$

Sendo  $n$  o número de réplicas do ponto central,  $x_i$  o valor de resposta de cada réplica e  $\bar{x}$  a média entre elas.

Para avaliar a significância estatística do modelo, foram comparadas as médias quadráticas de regressão ( $MS_{reg}$ ) e dos resíduos ( $MS_{res}$ ). De acordo com Pereira e Pereira-Filho (2018),  $MS_{reg}$  (7890,82) deve ser muito maior que  $MS_{res}$  (83,51). Além disso, a razão entre os valores de  $F_{calculado}$  (84,49) e  $F_{tabelado}$  (6,91) de regressão é maior que 10, o que indica que a regressão difere significativamente do resíduo. A média quadrática de falta de ajuste ( $MS_{falta\ de\ ajuste}$ , 152,24) foi maior que a média quadrática do erro puro ( $MS_{EP}$ , 14,78) e a razão entre  $F_{calculado}$  (10,30) e  $F_{tabelado}$  (19,00) de falta de ajuste foi menor que 1, o que indica que o modelo não apresenta falta de ajuste. Ademais, o valor de  $R^2$



(97,73%) indica que esta é a porcentagem dos dados que o modelo foi capaz de explicar, com uma variação explicável máxima igual à 99,5% ( $R^2_{max} = 0,995$ ).

Além disso, a significância estatística dos coeficientes foi avaliada e estes podem ser considerados significativos em um nível de confiança de 95%. Assim, foi obtida a equação de regressão (EQUAÇÃO 4.7), onde  $y$  é a desejabilidade,  $v_1$  corresponde à concentração do peptídeo e  $v_2$  é o volume do bioconjugado pep/PM no imunoensaio:

$$y = 101,303 + 37,179v_1 + 50,627v_2 \quad (\text{EQUAÇÃO 4.7})$$

Ademais, a influência das variáveis avaliadas na resposta final foi estudada. A concentração de peptídeo (variável 1) influencia cerca de 35,04%, enquanto o volume do bioconjugado pep/PM (variável 2) é que exerce maior influência na resposta (~ 64,91%). Entretanto, a interação entre as variáveis 1 e 2 (variável 3) não apresentou uma influência significativa. Deste modo, apenas individualmente as variáveis 1 e 2 têm efeito sobre a resposta.

Por fim, foram construídos os gráficos de contorno (FIGURA 4.7A) e de superfície (FIGURA 4.7B) para as respostas obtidas nos experimentos. Observou-se que um valor de  $\Delta F$  (%) maior (> 150%) pode ser obtido ao utilizar uma concentração de  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  de peptídeo e  $50 \mu\text{L}$  de bioconjugado – ou seja, a desejabilidade é mais próxima de 1 nestas condições. Entretanto, para o ensaio proposto, busca-se além de boa resposta amperométrica o uso de pequenas quantidades de reagentes, visando diminuir seu custo. Desta forma, um  $\Delta F$  (%) entre 100% e 150% possibilita observar a diferença entre uma amostra hanseniana e uma saudável ( $\Delta F$  (%)  $\approx 10\%$  nas mesmas condições), sendo assim suficiente para o diagnóstico. Portanto, foi escolhida a concentração de  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  de peptídeo e o volume de  $30 \mu\text{L}$  de pep/PM para a realização dos imunoensaios.

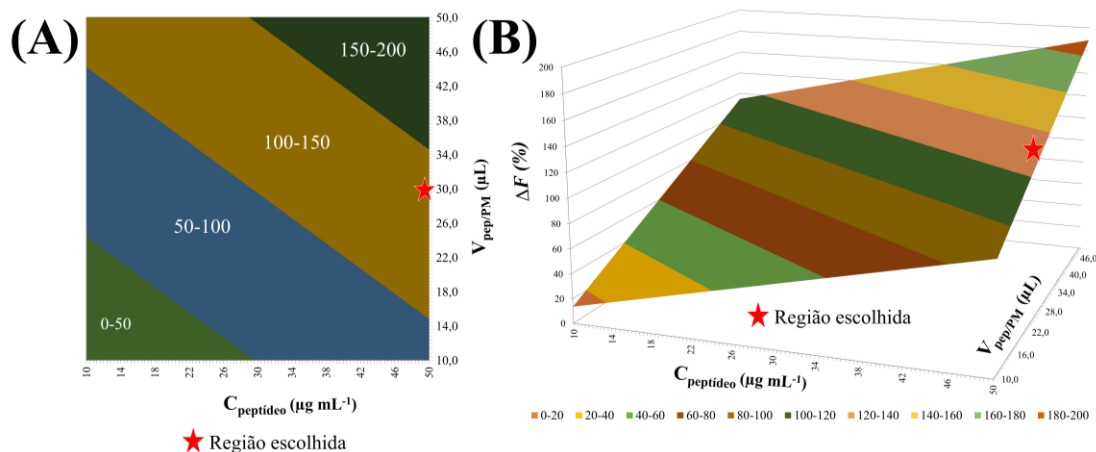


FIGURA 4.7 - (A) Gráfico de contorno (valores de  $\Delta F$  (%) inseridos em branco) e (B) gráfico de superfície de resposta (valores de  $\Delta F$  (%) inseridos abaixo) para diferentes concentrações de peptídeo e volumes de pep/PM.

Fonte: A autora.

#### 4.2.3 – Curva de diluição da amostra

Diferentes diluições da mesma amostra MB foram analisadas: 1:400 (mais diluída), 1:350, 1:250, 1:100 e 1:50 (menos diluída). Como é possível observar na FIGURA 4.8A, o sinal de corrente transiente é mais intenso com amostras menos diluídas, indicando que este pode ser relacionado com a quantidade de anticorpos presente no soro. Deste modo, amostras com alto nível de anticorpos tendem a apresentar resposta amperométrica mais intensa do que as com poucos anticorpos. Isso indica que amostras menos diluídas não apresentaram queda de sinal analítico devido à maior concentração da amostra.

A FIGURA 4.8B apresenta a relação entre estas diluições e a resposta obtida pela normalização do sinal de corrente transiente obtida da amostra com relação à corrente do branco (soro de bezerro). Com o aumento da corrente de pico transiente observado na FIGURA 4.8A para amostras menos diluídas, obtém-se também aumento do valor de  $\Delta F$  (%), indicando a eficiente normalização dos dados obtidos.

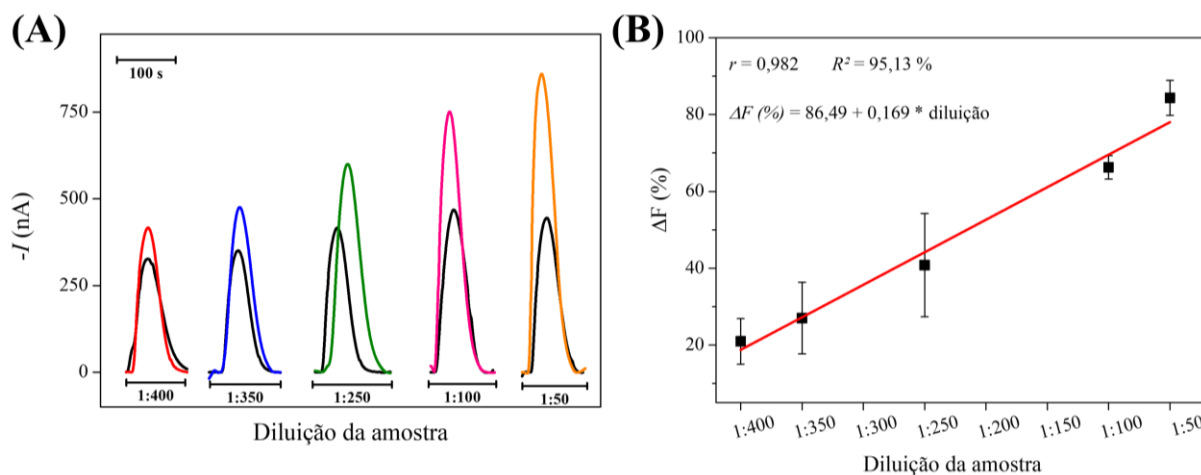


FIGURA 4.8 - (A) Sinais de corrente transiente para diferentes diluições da amostra de soro humano: (●) 1:400; (●) 1:350; (●) 1:250; (●) 1:100; (●) 1:50; (●) branco (soro de bezerro) em cada diluição. (B) Correlação entre diluição da amostra e  $\Delta F$ (%), calculado a partir da resposta de corrente transiente obtida.

Fonte: A autora.

A validação da linearidade está apresentada na TABELA 4.3, composta pelos valores de  $r$ ,  $R^2$ ,  $F_{regressão}$  e  $F_{falta\ de\ ajuste}$ , bem como pelos coeficientes linear e angular da equação da reta. Os valores de  $r$  e  $R^2$  (0,982 e 88,37%, respectivamente) indicam que há correlação linear entre o quanto a amostra é diluída e o  $\Delta F$ (%) calculado. Pode-se observar que o valor de  $F_{regressão}$  é maior que o  $F_{crítico}$  e o de  $F_{falta\ de\ ajuste}$  é menor que o  $F_{crítico}$  no nível de 95% de confiança. Isso indica que a regressão realizada foi significativa e que não há falta de ajuste dos dados ao modelo linear utilizado. Isso é corroborado pelo valor de  $p_{regressão} < 0,05$  e  $p_{falta\ de\ ajuste} > 0,05$ . Além disso, ambos os coeficientes apresentam  $t_{observado} > t_{crítico}$ , sendo assim significativos ( $\neq 0$ ). Ambos os valores de  $p < 0,05$  confirmam a significância estatística da equação da reta.

TABELA 4.3 - Resultados da análise de regressão linear no intervalo de 95% de confiança

| <i>Validação da Linearidade</i>           |                               |  |                          |          |          |                      |
|---|-------------------------------|--|--------------------------|----------|----------|----------------------|
|   | <i>Regressão</i>              |  | <i>Falta de ajuste</i>   |          | <i>r</i> | <i>R<sup>2</sup></i> |
|   | <i>F<sub>regressão</sub>*</i> | <i>p</i>   | <i>F<sub>faj</sub>**</i> | <i>p</i> |          |                      |
|   | <b>197,61</b>                 | 0,000  | <b>1,67</b>              | 0,200    | 0,982    | 88,37%               |
| <i>Coefficientes da reta de regressão</i> |                               | <i>t<sub>observado</sub>***</i>                              |                          | <i>p</i> |          |                      |
| Intercepto = 86,49 ± 3,27                 |                               | 26,69  |                          | 0,000    |          |                      |
| Inclinação = -0,169 ± 0,0123              |                               | 14,06  |                          | 0,000    |          |                      |
| <b>Equação da curva analítica</b>         |                               | $\Delta F (\%) = 86,49 + 0,169 * \text{diluição da amostra}$ |                          |          |          |                      |

\* $F_{\text{critico}}(0,025; 1,26) = 4,66$ . \*\*  $F_{\text{critico}}(0,025; 3,23) = 3,75$ . \*\*\* $t_{\text{critico}}(0,05; 27) = 2,05$ .

Fonte: A Autora.

Deste modo, pode-se afirmar que a relação entre a resposta de  $\Delta F(\%)$  e a concentração de anticorpos anti-*M. leprae* (representada pela diluição) é linear, mesmo utilizando uma amostra complexa como a de soro humano.

#### 4.2.4 – Precisão do imunoensaio

A precisão do dispositivo foi avaliada em três níveis: intradispositivo, intradias e interdias. Para cada arranjo de 8 eletrodos, foram selecionados os valores de corrente transiente de 5 réplicas. Isto possibilita desconsiderar valores atípicos (*outliers*) que podem ser explicados devido à erros relacionados ao processo de serigrafia, de aplicação do imunoensaio sobre a superfície eletródica ou à problemas de contato elétrico e ruído de fundo. Ademais, os ensaios avaliados neste estudo correspondem à um mesmo lote de PMs e de eletrodos (ou seja, PMs modificadas / eletrodos serigrafados em um mesmo processo), visando diminuir tais interferências.

Os resultados podem ser observados nos gráficos de barra na FIGURA 4.9. Para as análises intradias (mesmo dia, dispositivos diferentes; FIGURA 4.9A), o DPR foi de 9,8%, enquanto que para as análises interdias (dias

diferentes; FIGURA 4.9B) foi de 12,3%. Já o valor de DPR para as réplicas obtidas para um mesmo arranjo (FIGURA 4.9C) foi de 7,5%. Tais valores são considerados pequenos, uma vez que os ensaios avaliados envolvem a detecção diretamente na amostra de soro, não fazendo uso de anticorpos padrão cujas condições podem ser controladas. Ademais, estão abaixo de 15,0%, que é o limite reportado na literatura como aceitável para imunoenaios e demais métodos bioanalíticos<sup>187,188</sup>.

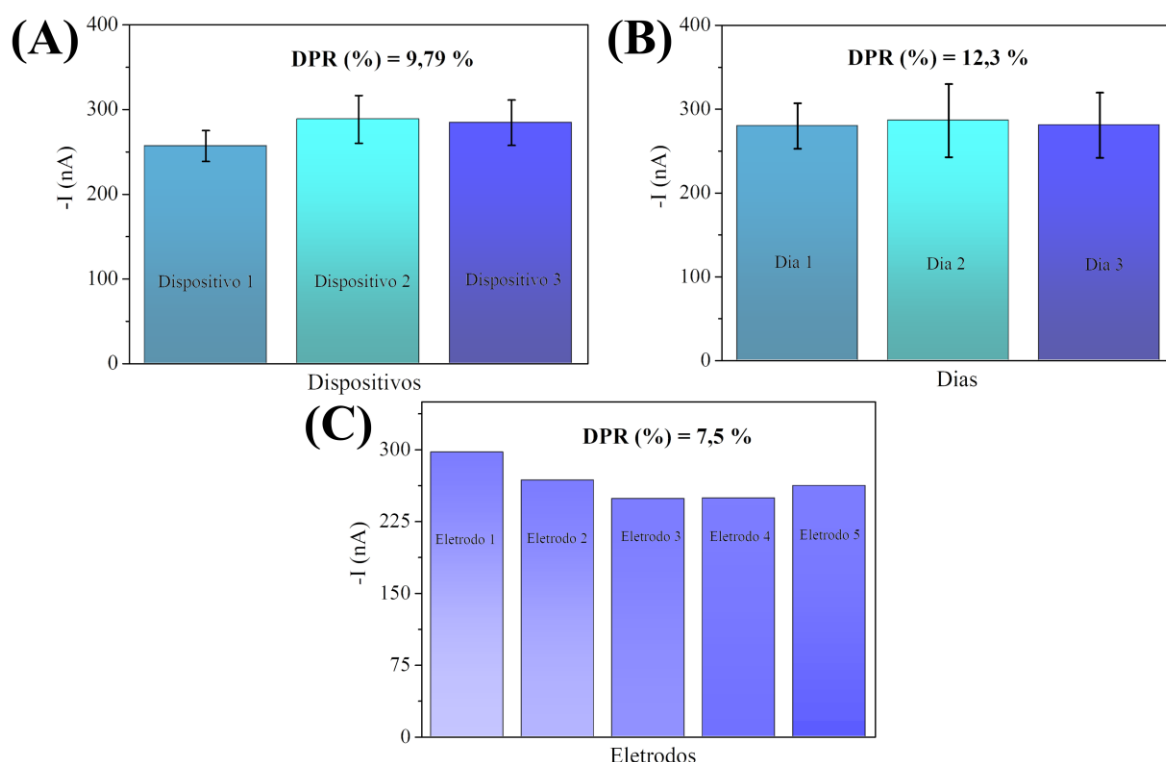


FIGURA 4.9 - Gráfico de barras referente ao estudo de precisão (A) intradias (mesmo dia, dispositivos diferentes); (B) interdias (dias diferentes); (C) 5 eletrodos de um mesmo dispositivo.

Fonte: A autora.

#### 4.2.5 – Desempenho do imunoenensaio para diagnóstico sorológico de hanseníase

Para avaliar o desempenho do imunoenensaio para diagnóstico de hanseníase, inicialmente utilizou-se uma amostra de cada coorte (indivíduo saudável, PB e MB). Além destas, foi analisada uma amostra de soro fetal bovino,

sendo utilizada como branco devido a apresentar uma matriz complexa similar como o soro humano. Os sinais de corrente transiente foram processados simultaneamente nos 8 eletrodos do arranjo, sendo obtidos com a injeção de 50  $\mu\text{L}$  de uma solução mista de 2,0  $\text{mmol L}^{-1}$  de HQ e 1,0  $\text{mmol L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Os resultados podem ser observados na FIGURA 4.10. Nota-se que há diferença de resposta de corrente transiente entre as amostras hansenianas e a saudável, sendo os sinais de corrente transiente da sadia similar aos do branco. Ademais, é possível observar que há diferença entre os dois níveis da doença, onde os casos MB tendem a apresentar corrente transiente mais intensa que os PB devido ao seu alto título de anticorpos.

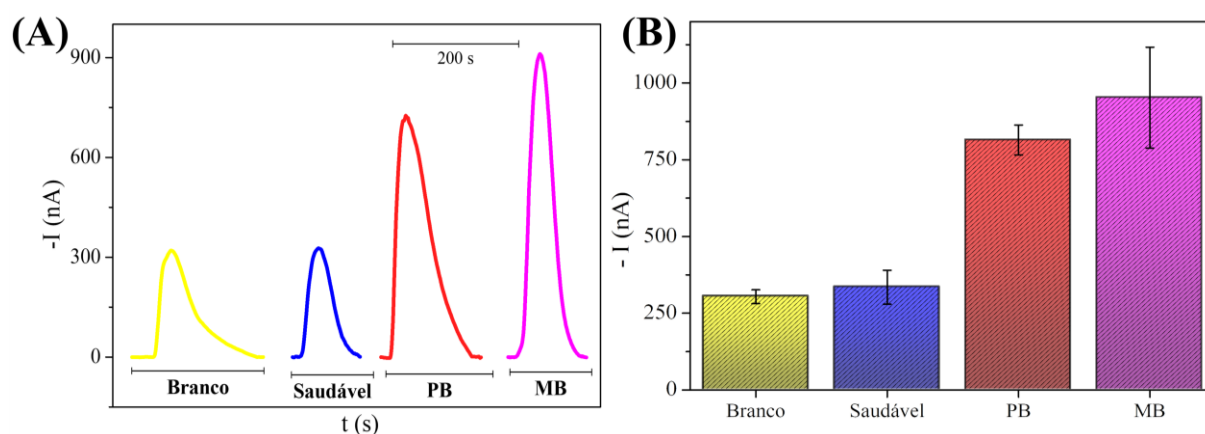


FIGURA 4.10 - (A) Sinal de corrente transiente e (B) gráfico de corrente resultante dos eletrodos de um mesmo arranjo para amostras: (●) soro fetal bovino (branco); (●) indivíduo saudável; (●) PB; (●) MB.

Fonte: A autora.

Após, foram avaliadas 49 amostras de soro divididas entre indivíduos previamente diagnosticados como saudáveis ( $n = 15$ ), PB ( $n = 16$ ) e MB ( $n = 18$ ). Para tal, utilizou-se uma diluição de amostra de 1:50 em PBS 7,4, sendo a que apresentou a maior resposta de  $\Delta F$  (%)<sup>122</sup>. Deste modo, foi avaliado o uso deste imunensaio para a diferenciar amostras hansenianas de indivíduos saudável, bem como para classificar os casos positivos da doença.

Como pode ser observado na FIGURA 4.11, amostras de soro de indivíduos negativos para a doença apresentam valor de  $\Delta F(\%)$  menores do que os apresentados por pacientes positivos. Esta diferença é estatisticamente significativa, com  $p < 0,05$ , o que indica a eficiência do imunoensaio. Também, nota-se que há diferença entre os dois níveis da doença, sendo que pacientes MB apresentam  $\Delta F(\%)$  mais intenso do que os PB.

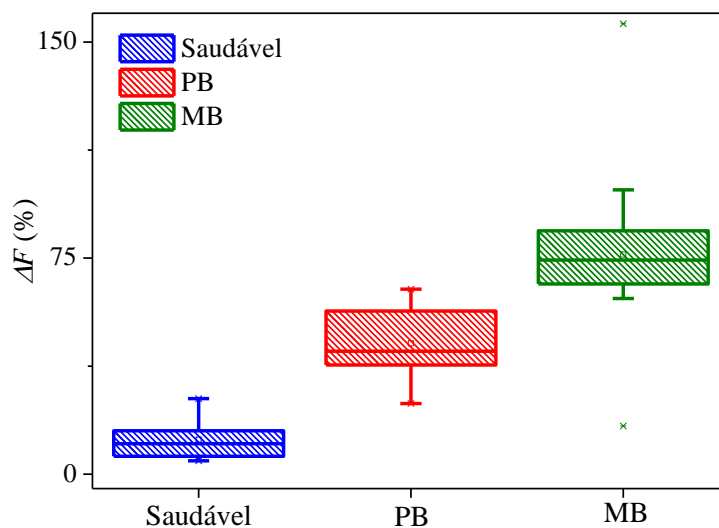


FIGURA 4.11 - Diagrama de caixas para os valores de  $\Delta F(\%)$  encontrados para indivíduos (●) saudáveis; (●) pacientes PB; e (●) pacientes MB. ( $p < 0,05$ ).

Fonte: A autora.

Adicionalmente, uma curva ROC também foi utilizada para avaliar a sensibilidade e especificidade do imunoensaio. A curva ROC é avaliada por meio da área sob a curva (AUC, do inglês *area under the curve*). Quanto mais próximo o valor de AUC estiver de 1, maior é a eficiência do método em diferenciar indivíduos positivos e negativos. Assim, valores acima de 0,9 são considerados excelentes, entre 0,8 e 0,9 são bons e entre 0,7 e 0,8 são tidos como aceitáveis. Já valores próximos de 0,5 indicam que o método não é capaz de realizar o diagnóstico<sup>189,190</sup>. Assim, a curva ROC para o dispositivo desenvolvido está apresentada na FIGURA 4.12, obtida por meio da resposta de  $\Delta F(\%)$  para indivíduos negativos para a doença e positivos (PB + MB). O dispositivo foi capaz

de diferenciar amostras hansenianas e não hansenianas com 91,2% de sensibilidade e 100% de especificidade para o valor de corte de  $>26,235\%$  ( $\Delta F$  (%) maior que este valor indica a presença da doença). O valor de AUC igual à 0,9902 indica a eficiência do diagnóstico, com excelente capacidade discriminatória entre amostras positivas e negativas para hanseníase.

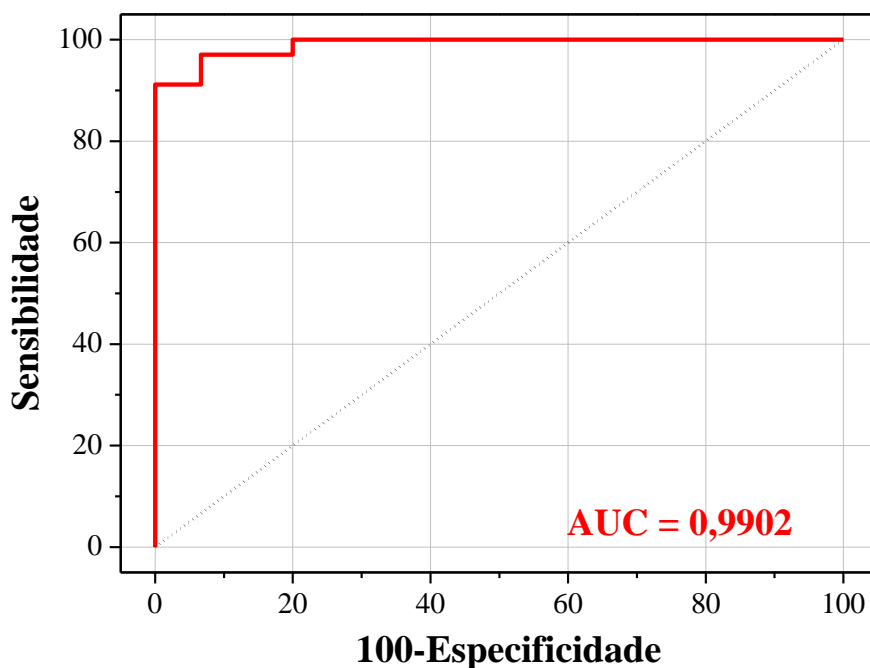


FIGURA 4.12 - Curva ROC para diagnóstico de hanseníase. Resposta de indivíduos saudáveis vs pacientes hansenianos PB + MB.

Fonte: A autora.

Complementarmente, foi avaliada a capacidade do imunossensor distinguir cada nível da doença de maneira independente. Os dados foram representados por meio de diagramas de pontos (FIGURA 4.13), referentes aos resultados obtidos para cada grupo (pontos em eixos verticais), assinalando também o valor de corte (linha horizontal). É possível observar alta sensibilidade e 100% de especificidade para diagnóstico de casos PB (FIGURA 4.13A) e MB (FIGURA 4.13B). Além disso, é possível também diferenciar os casos PB dos MB (FIGURA 4.13C) definindo um valor de corte de  $>60,506\%$  ( $\Delta F$  (%) maior que este valor indica caso MB). Isso indica que o imunoenensaio pode ser aplicado



tanto para diagnóstico de hanseníase quanto para classificação dos casos positivos, contribuindo para o início e orientação de um tratamento adequado ao caso do paciente.

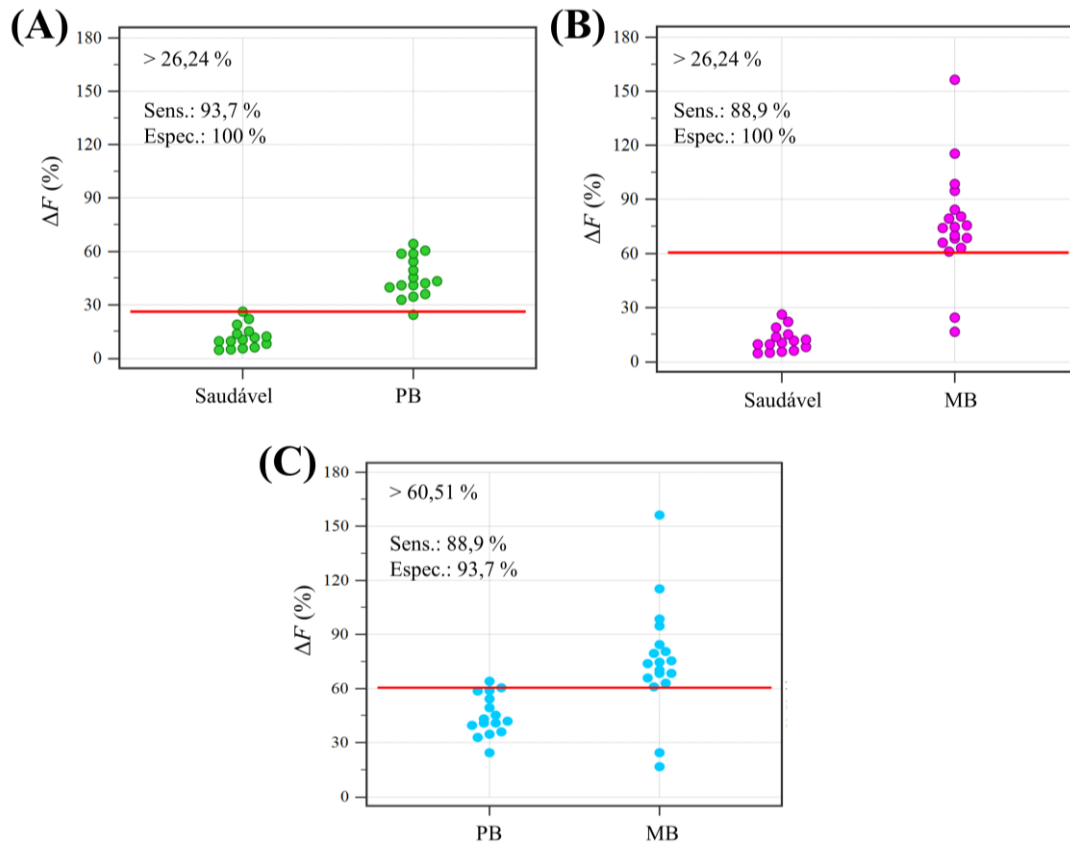


FIGURA 4.13 - Diagrama de pontos para diferentes níveis de hanseníase, avaliados independentemente. (A) saudável (não hansenianos) vs PB; (B) saudável (não hansenianos) vs MB; (C) PB vs MB.

Fonte: A autora.

Além disso, utilizou-se um teste  $t$  para avaliar se a diferença obtida entre os grupos é estatisticamente significativa no nível de 95% de confiança. É considerado que a diferença entre as amostras é significativa quando o valor de  $t$  obtido é maior que o valor de  $t$  tabelado, e o valor de  $p$  é menor do que 0,05. Os resultados obtidos estão representados na TABELA 4.4, sendo PB vs Saudável, MB vs Saudável e PB vs MB. Considerando que os valores de  $t$  são maiores que o  $t$  tabelado e os de  $p$  são menores que 0,05, pode-se considerar que o imunoenensaio

foi capaz de diferenciar as amostras entre si isoladamente com significância estatística.

TABELA 4.4 - Análise da significância estatística das diferenças de resposta entre diferentes grupos individualmente

|                            | <b>Saudável vs<br/>Hanseniano</b> | <b>PB vs<br/>Saudável</b> | <b>MB vs<br/>Saudável</b> | <b>PB vs<br/>MB</b> |
|----------------------------|-----------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------|
| <b>Valor de corte</b>      | >26,24%                           | >26,24%                   | >26,24%                   | >60,51%             |
| <b>Sensibilidade</b>       | 91,2%                             | 93,7%                     | 88,9%                     | 88,9%               |
| <b>Especificidade</b>      | 93,7%                             | 100%                      | 100%                      | 93,7%               |
| <b><i>p</i></b>            | < 0,0001                          | < 0,0001                  | < 0,0001                  | < 0,0001            |
| <b><i>t</i> calculado*</b> | 9,872                             | 10,041                    | 8,003                     | 3,812               |
| <b><i>t</i> tabelado*</b>  | 2,012                             | 2,045                     | 2,039                     | 2,037               |

\* 95% de confiança. Fonte: A autora.

### 4.3 – Considerações parciais

Um magneto-imunoensaio foi desenvolvido utilizando o peptídeo APDDPAWQNIFNLRR para captura de anticorpos anti-*M. leprae*. Para a detecção, foram construídas células microfluídicas capazes de realizar até 8 réplicas simultâneas, com resultados obtidos por meio da técnica de amperometria.

O processo de ancoragem do peptídeo às PMs foi avaliado por UV-Vis, que indicou a eficiência do processo. Ademais, um planejamento experimental indicou as condições ótimas de concentração de peptídeo adicionada às PMs e o volume do bioconjugado pep/PM adicionado ao ensaio para captura dos anticorpos.

A curva de diluição indicou que a relação entre a resposta de  $\Delta F$  (%) e a concentração de anticorpos anti-*M. leprae* é linear e que não sofreu queda de sinal analítico em amostras menos diluídas. Deste modo, para o restante do trabalho, optou-se por utilizar a amostra menor diluída (1:50), que apresentou maior resposta eletroquímica.

O imunoensaio foi avaliado em amostras de soro humano. A precisão apresentada pelos ensaios foi alta, com valores de DPR (%) abaixo de 15%. Adicionalmente, ao avaliar cada coorte, observou-se uma diferença de resposta entre elas. Assim, as amostras saudáveis apresentam sinal analítico próximo ao do branco. Já as amostras positivas apresentam resposta analítica mais intensa, inclusive diferenciando entre os dois níveis da doença. Essa diferença entre as coortes é estatisticamente significativa no nível de 95% de confiança.

Por meio da curva ROC e dos diagramas de pontos, observou-se que o diagnóstico de hanseníase pode ser realizado utilizando o magneto-imunoensaio desenvolvido. Os resultados obtidos indicam alta especificidade e sensibilidade do diagnóstico e também da classificação da doença, podendo ser utilizado também para diferenciar casos PB dos MB.



***DESENVOLVIMENTO  
DE IMUNOENSAIO PARA  
DETECÇÃO DE ANTI-  
M.LEPRAE UTILIZANDO O  
PEPTÍDEO  
SGLSQVTGLFGVPGL***

***Capítulo 5***

## **5 - DESENVOLVIMENTO DE IMUNOENSAIO PARA DETECÇÃO DE ANTI-M. LEPRAE UTILIZANDO O PEPTÍDEO SGLSQVTGLFGVPGL**

### **5.1 – Procedimento experimental**

#### *5.1.1 – Reagentes e soluções*

Tris(hidroximetil)aminometano-hidrocloreto (Tris-HCl,  $\geq 99\%$ ) e 1-naftil fosfato (1-NPP, 99%) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

Os anticorpos humanos IgG marcados com a enzima fosfatase alcalina (ALP) (produzido em cabra, código ab97167) foram obtidos da Abcam (Cambridge, MA, EUA).

Tris-HCl foi preparado em água ultrapura na concentração de 10 mmol L<sup>-1</sup> e seu pH foi posteriormente ajustado para 8,0. Tris-HCl-Tween 20 foi utilizado entre as etapas do imunoensaio para lavagem, sendo preparado em concentração de 0,05% (m/v) e mantido à 4°C.

IgG/ALP 1,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  foi preparada em Tris-HCl pH 8,0 imediatamente antes do uso. A solução de 1-NPP foi preparada em Tris-HCl-Tween 20 na concentração de 1,0 mmol L<sup>-1</sup>, sendo armazenada por até 24h a 4°C.

Os demais reagentes e soluções utilizados foram descritos nos capítulos anteriores (itens 3.1.1 e 4.1.1).

#### *5.1.2 – Instrumentação e materiais*

Neste trabalho, utilizou-se um teclado de injeção para adição do bioconjugado final. Este teclado foi modelado usando o *software* Autodesk Inventor Pro 2022 e fatiado usando o *software* Ultimaker Cura versão 4.8.0. A fabricação foi feita pelo processo de impressão 3D de uma extrusora com impressora Two Tress Bluer versão 2 V2 mesa autonivelante 235 × 235 × 280 mm (China). As peças foram impressas em filamento de polietileno tereftalato modificado com glicol (PETG) (3Dfila, Brasil) e unidas por um parafuso metálico

de 5 milímetros de diâmetro e 20 centímetros de comprimento adquirido no mercado local.

Os demais instrumentos e materiais utilizados foram descritos nos capítulos anteriores (itens 3.1.2 e 4.1.2).

### *5.1.3 – Ancoragem do peptídeo à PM*

O processo de ancoragem do peptídeo à PM foi realizado similarmente ao descrito no item 4.1.5 e representado na FIGURA 4.4.

Inicialmente, foi realizada lavagem das PMs com tampão MES 50 mmol L<sup>-1</sup> pH 5,2. Em seguida, a ativação dos grupos carboxílicos na superfície das PMs foi feita utilizando EDC (0,4 mol L<sup>-1</sup>) / NHS (0,1 mol L<sup>-1</sup>) por 30 minutos sob agitação leve. Etapas de lavagem (3x) foram realizadas com tampão MES 50 mmol L<sup>-1</sup> pH 5,2, com auxílio da estante magnética. O peptídeo (40 mg mL<sup>-1</sup>) foi adicionado em seguida e mantido sob agitação leve por 24h. Após, etapas de lavagem (3x) utilizaram solução PBS-Tween 20 0,05% (m/v) para retirada de peptídeos não ancorados às PMs. Por fim, foi realizado o bloqueio dos sítios de ligação não específicos utilizando 1,0 mol L<sup>-1</sup> de etanolamina pH 8,0 durante 60 minutos, seguida de lavagem com PBS-Tween 20 0,05% (m/v). O bioconjugado pep/PM foi suspenso em 500 µL de PBS-Tween 20 0,05% (m/v) e armazenado a 4°C para uso em até 21 dias.

### *5.1.4 – Captura de anti-M. leprae em amostras de soro*

A amostra de soro previamente diluída (1:250) em PBS pH 7,4 foi adicionada a 60 µL deste conjugado e mantida sob agitação leve durante 30 minutos. Após, adicionou-se uma solução de 3 µg mL<sup>-1</sup> IgG/ALP durante 1h. Entre cada etapa, foi realizada lavagem com Tris-HCl-Tween 20 0,05% (m/v), seguida de separação magnética. Finalmente, o bioconjugado ALP/IgG/Ac/pep/PM foi suspenso em 1,0 mL de Tris-HCl-Tween 20 0,05% (m/v). Este processo está representado na FIGURA 5.1.

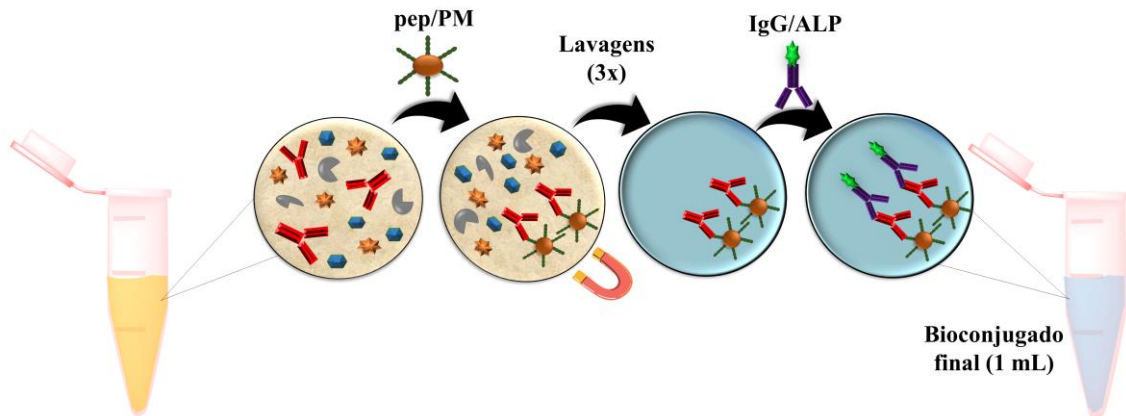


FIGURA 5.1 - Adição de pep/PM à amostra contendo anticorpos anti-*M. leprae*; Separação magnética do bioconjugado Ac/pep/PM para lavagem e eliminação dos demais interferentes da amostra; Adição de ALP/IgG; Separação magnética do bioconjugado ALP/IgG/Ac/pep/PM para lavagem e eliminação de partículas em excesso.

Fonte: A autora.

### 5.1.5 – Adição do bioconjugado à superfície eletródica

Para a captura do bioconjugado ALP/IgG/Ac/pep/PM na superfície do eletrodo, foi utilizada uma plataforma construída na impressora 3D, conforme apresentada na FIGURA 5.2. Este teclado foi desenvolvido visando tornar o processo de injeção do bioconjugado semiautomatizado, eliminando possíveis erros relacionados à adição manual. Para isso, utilizou-se uma vazão de  $150 \mu\text{L min}^{-1}$  e uma válvula de  $100 \mu\text{L}$ .



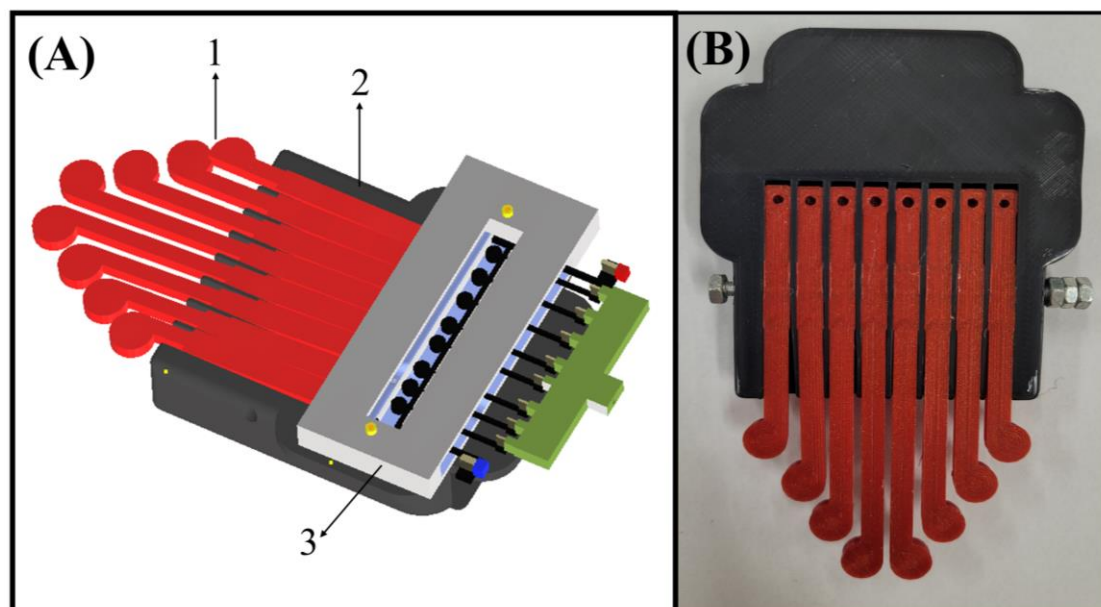


FIGURA 5.2 - A) Esquema do teclado de injeção utilizado neste estudo, com seus componentes: 1) 8 teclas (vermelho), 2) base do teclado e 3) dispositivo microfluídico posicionado. (B) Foto real do teclado de injeção pronto para uso.

Fonte: A autora.

A eficiência do teclado de injeção foi avaliada em comparação com o método de aplicação manual, o mesmo utilizado no ensaio anterior. Assim, foram utilizados dois dispositivos distintos. No primeiro dispositivo, 100  $\mu\text{L}$  do imunoenensaio foram injetados para cada eletrodo do arranjo. Para cada injeção, o ímã foi posicionado logo abaixo do eletrodo, utilizando o teclado de injeção, conforme apresentado na FIGURA 5.3. O bioconjugado foi então atraído para a superfície eletródica ao passar pelo canal microfluídico, um eletrodo por vez, conforme as teclas foram abaixadas. No segundo dispositivo, os ímãs foram posicionados abaixo dos eletrodos e 3  $\mu\text{L}$  do ensaio foi aplicado com o auxílio de uma micropipeta. Após 10 s, a gota formada na superfície eletródica foi retropipetada, deixando apenas o bioconjugado atraído pelo ímã (item 4.1.7).

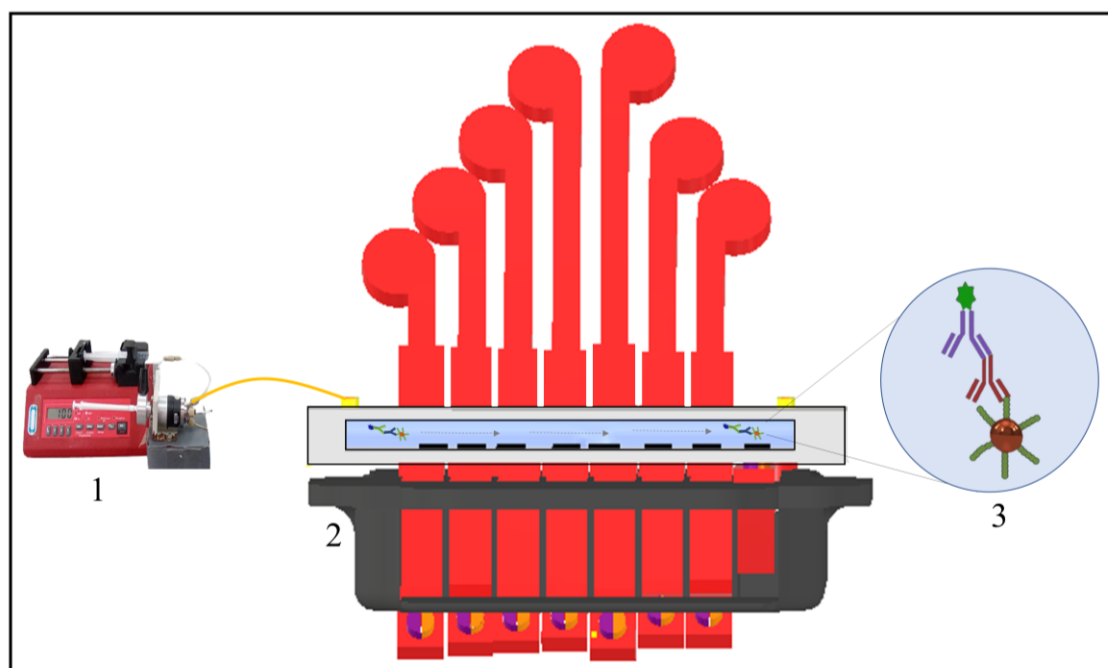


FIGURA 5.3 - Esquema da injeção do bioconjugado utilizando o teclado de injeção. O dispositivo microfluídico é acoplado à 1) válvula injetora e à bomba de seringa, e posicionado sobre o 2) teclado de injeção. 3) O bioconjugado é adicionado e percorre o canal microfluídico até chegar ao ímã, posicionado abaixo do eletrodo ao abaixar a última tecla.

Fonte: A autora.

### 5.1.6 – Sistema microfluídico com detecção eletroquímica

O dispositivo microfluídico descartável foi construído utilizando o mesmo processo descrito no capítulo anterior (item 4.1.3). Devido ao uso do teclado, entretanto, foi necessário ampliar a distância entre os eletrodos de trabalho e, conseqüentemente, o canal microfluídico e os demais eletrodos para que não houvesse interferência entre os campos magnéticos dos ímãs de cada tecla. Assim, o dispositivo foi composto por um arranjo com 8 eletrodos de trabalho (3,0 mm de diâmetro superficial, com 2,8 mm de distância entre eletrodos) e um arranjo com um eletrodo de referência (41 x 1,5 mm) e um eletrodo auxiliar (38 x 1,8 mm). O canal microfluídico foi cortado com as dimensões 48 x 4,0 x 0,4 mm e 76,8  $\mu$ L de volume interno.

Ademais, o sistema microfluídico utilizado neste trabalho é o mesmo reportado no capítulo anterior (item 4.1.4, FIGURA 4.2).

A detecção eletroquímica foi realizada utilizando a técnica de amperometria com aplicação de um potencial fixo de 0,3 V<sup>191,192</sup> durante 2000 segundos. Como solução carreadora, utilizou-se Tris-HCl pH 8,0, uma alça de amostragem de 100 µL e vazão de 50 µL min<sup>-1</sup> para a injeção da solução de detecção (1-NPP). Neste caso, a enzima ALP atua como catalisador da hidrólise do 1-NPP (FIGURA 5.4), formando fosfato e 1-naftol (1-NP). O 1-NP é uma espécie eletroquimicamente ativa que, ao que o potencial é aplicado, é oxidada à naftoquinona na superfície eletródica<sup>193-195</sup>.

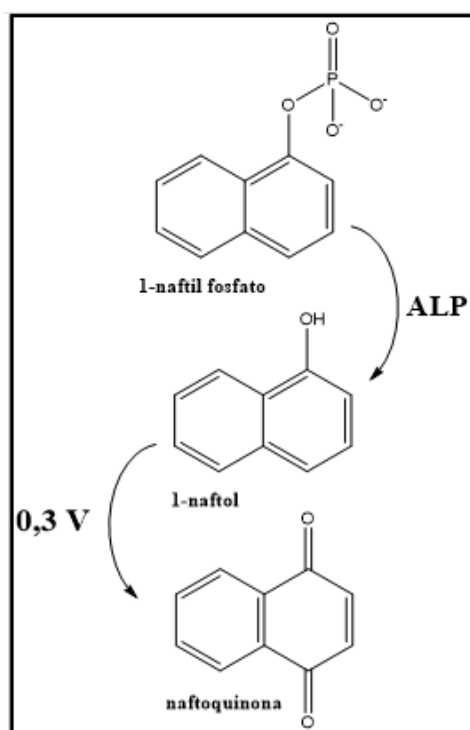


FIGURA 5.4 - Hidrólise do 1-NPP catalisada pela enzima ALP.

Fonte: Adaptado de El-Moghazy *et. al*<sup>193</sup>.

### 5.1.7 – Otimização das condições experimentais

A melhor condição experimental do ensaio foi estudada por meio de um planejamento fatorial composto central para múltiplas respostas com triplicata do ponto central. Como pode ser observado na TABELA 5.1, este planejamento avaliou três variáveis: concentração do substrato 1-NPP, concentração de

IgG/ALP e diluição da amostra. Inicialmente, foi proposto um planejamento fatorial  $2^3$  (experimentos de 1 a 8) com as variáveis codificadas entre  $-1$  e  $+1$ . Os experimentos de 9 a 14 (variáveis codificadas entre  $-1,68$  e  $+1,68$ ) representam os pontos axiais e os experimentos de 15 a 17 representam as três réplicas do ponto central (variáveis codificadas em 0). Para cada experimento, foram avaliadas três amostras (branco, controle e MB). As variáveis independentes foram as respostas normalizadas, obtendo-se assim três respostas de valores de  $\Delta F$  (%): branco e controle ( $\Delta F_{B-C}$ ), controle e MB ( $\Delta F_{C-MB}$ ) e branco e MB ( $\Delta F_{B-MB}$ ). Mantiveram-se fixas as condições do bioconjugado pep/PM ( $44,4 \mu\text{g mL}^{-1}$  de peptídeo e  $60 \mu\text{L}$  de pep/PM).

TABELA 5.1 - Planejamento fatorial para otimização do imunoensaio

| Experimento | $C_{\text{substrato}}$ |                                 | $C_{\text{IgG/ALP}}$ |                                   | Diluição   |         |
|-------------|------------------------|---------------------------------|----------------------|-----------------------------------|------------|---------|
|             | Codificado             | Real<br>(mmol L <sup>-1</sup> ) | Codificado           | Real<br>( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) | Codificado | Real    |
| 1           | 1                      | 3,0                             | 1                    | 3,0                               | 1          | 1:100   |
| 2           | 1                      | 3,0                             | 1                    | 3,0                               | -1         | 1:300   |
| 3           | 1                      | 3,0                             | -1                   | 1,0                               | 1          | 1:100   |
| 4           | 1                      | 3,0                             | -1                   | 1,0                               | -1         | 1:300   |
| 5           | -1                     | 1,0                             | 1                    | 3,0                               | 1          | 1:100   |
| 6           | -1                     | 1,0                             | 1                    | 3,0                               | -1         | 1:300   |
| 7           | -1                     | 1,0                             | -1                   | 1,0                               | 1          | 1:100   |
| 8           | -1                     | 1,0                             | -1                   | 1,0                               | -1         | 1:300   |
| 9           | 1,68                   | 3,68                            | 0                    | 2,0                               | 0          | 1:200   |
| 10          | -1,68                  | 0,32                            | 0                    | 2,0                               | 0          | 1:200   |
| 11          | 0                      | 2,0                             | 1,68                 | 3,68                              | 0          | 1:200   |
| 12          | 0                      | 2,0                             | -1,68                | 0,32                              | 0          | 1:200   |
| 13          | 0                      | 2,0                             | 0                    | 2,0                               | 1,68       | 1:75    |
| 14          | 0                      | 2,0                             | 0                    | 2,0                               | -1,68      | 1:15000 |
| 15          | 0                      | 2,0                             | 0                    | 2,0                               | 0          | 1:200   |
| 16          | 0                      | 2,0                             | 0                    | 2,0                               | 0          | 1:200   |
| 17          | 0                      | 2,0                             | 0                    | 2,0                               | 0          | 1:200   |

Fonte: A autora.

Foi realizado o cálculo de um modelo de regressão linear, utilizando o *software* livre Octave, na versão *Guide user interface* (GUI), com a rotina computacional “*regression2*”<sup>174</sup>. Empregando a EQUAÇÃO 5.1, cujos termos derivam do modelo de regressão, foram então desenhados gráficos de contorno e superfície de resposta utilizando um *template* fornecido por Pereira e Pereira-Filho<sup>186</sup> no *software* Excel, de modo a verificar a região de máxima desejabilidade (*D*).

$$D = b_0 + b_1v_1 + b_2v_2 + b_3v_3 + b_{11}v_1^2 + b_{22}v_2^2 + b_{33}v_3^2 + b_{12}v_1v_2 + b_{13}v_1v_3 + b_{23}v_2v_3 \quad (\text{EQUAÇÃO 5.1})$$

Sendo *y* a resposta, *b*<sub>0</sub> o coeficiente constante que estima o valor médio populacional de todas as respostas, *b*<sub>1</sub>, *b*<sub>2</sub> e *b*<sub>3</sub> são os coeficientes lineares dos efeitos principais, *b*<sub>11</sub>, *b*<sub>22</sub> e *b*<sub>33</sub> são os coeficientes quadráticos e *b*<sub>12</sub>, *b*<sub>13</sub> e *b*<sub>23</sub> correspondes às variáveis e suas interações, obtidos a partir do modelo de regressão<sup>171</sup>.

### 5.1.8 – Precisão do imunoensaio

A precisão do imunoensaio foi avaliada de três maneiras: análise de 7 réplicas de um arranjo; análise de 7 réplicas de 3 dispositivos construídos no mesmo dia; e análise de 7 réplicas de 3 dispositivos, cada um construído em um dia diferente. Os resultados foram expressos em termos de DPR (%), conforme a EQUAÇÃO 3.2.

### 5.1.9 – Desempenho do imunoensaio para diagnóstico sorológico de hanseníase

O imunoensaio foi aplicado em 49 amostras de soro de pacientes com hanseníase e indivíduos sadios. As amostras são as mesmas avaliadas no ensaio

descrito no capítulo anterior, de modo a poder futuramente comparar as duas plataformas de diagnóstico. A análise utilizou um dispositivo para cada amostra, tendo os resultados obtidos normalizados utilizando a EQUAÇÃO 4.4.<sup>183</sup>. Por fim, construiu-se uma curva ROC foi construída para avaliar a qualidade do diagnóstico clínico fornecido pelo imunossensor desenvolvido.

## 5.2 – Resultados e discussão

### 5.2.1 – Eficiência do teclado de injeção

A resposta de corrente transiente obtida com o teclado de injeção foi comparada com a obtida manualmente, a fim de avaliar sua eficiência. Os resultados podem ser vistos na FIGURA 5.5. É possível observar que a corrente transiente obtida com o teclado de injeção é cerca de 2,5 vezes mais intensa do que a obtida com a pipetagem do bioconjugado.

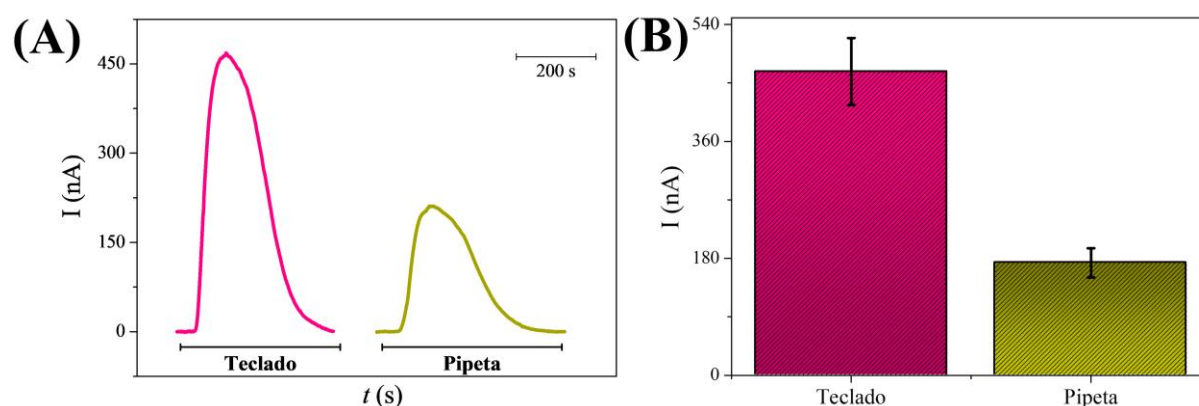


FIGURA 5.5 - (A) Sinal de corrente transiente e (B) gráfico de corrente resultante dos eletrodos de um mesmo arranjo. Adicionou-se sobre os eletrodos o bioconjugado utilizando (●) teclado de injeção e (●) pipeta automática.

Fonte: A autora.

Um sinal de corrente transiente mais alto corresponde a uma maior concentração da enzima ALP na superfície do eletrodo. Isso indica que o teclado de injeção foi capaz de atrair mais bioconjugado à superfície eletródica do que a adição pelo método manual. Deste modo, pode-se considerá-lo mais eficiente para este propósito.

## 5.2.2 – Otimização das condições experimentais

### 5.2.2.1 – Ajuste do modelo do planejamento experimental

Para encontrar as melhores condições experimentais da detecção de anti-*M. leprae* na amostra de soro, foi executado um planejamento fatorial composto central para múltiplas respostas. Assim, foram utilizados os valores de  $\Delta F$  (%) referentes a três relações: branco e controle ( $\Delta F_{B-C}$ ), controle e MB ( $\Delta F_{C-MB}$ ) e branco e MB ( $\Delta F_{B-MB}$ ). As variáveis dependentes em seus respectivos níveis de variação, as três respostas obtidas e a desejabilidade global estão descritos na TABELA 5.2, sendo  $v1$  = concentração do substrato 1-NPP,  $v2$  = concentração de IgG/ALP e  $v3$  = diluição da amostra.

Com base nestes dados, foram calculados três modelos de regressão individuais para cada resposta empregando a rotina “regression2” para estabelecer os pesos (nível de importância) para cada um. Todos os modelos apresentaram falta de ajuste e baixos valores de regressão. A segunda resposta ( $\Delta F_{C-MB}$ ) apresentou a menor falta de ajuste dentre as três, de modo que lhe foi atribuído peso 3. Assim, a matriz de condição (critério para otimização das respostas analíticas) foi montada conforme a TABELA 5.3 para determinação da desejabilidade global utilizando a rotina “help mydes2”.

TABELA 5.2 - Planejamento fatorial composto central para múltiplas respostas para otimização das condições experimentais, respostas  $\Delta F(\%)$  obtidas e desejabilidade ( $D$ ) calculada

| Exp. | $v1$  | $v2$  | $v3$  | $\Delta F_{B-C} (\%)$ | $\Delta F_{C-MB} (\%)$ | $\Delta F_{B-MB} (\%)$ | $D$    |
|------|-------|-------|-------|-----------------------|------------------------|------------------------|--------|
| 1    | +1    | +1    | +1    | 135,60                | -34,85                 | 53,48                  | 0,0231 |
| 2    | +1    | +1    | -1    | 59,85                 | -16,69                 | 33,18                  | 0      |
| 3    | +1    | -1    | +1    | 211,71                | -41,52                 | 82,27                  | 0      |
| 4    | +1    | -1    | -1    | 20,12                 | 45,37                  | 74,63                  | 0,4044 |
| 5    | -1    | +1    | +1    | 223,69                | 22,66618               | 297,04                 | 0,4956 |
| 6    | -1    | +1    | -1    | 278,93                | 9,18                   | 313,73                 | 0,3849 |
| 7    | -1    | -1    | +1    | 249,00                | -17,10                 | 189,32                 | 0,1557 |
| 8    | -1    | -1    | -1    | 230,37                | -31,15                 | 127,45                 | 0,0566 |
| 9    | +1,68 | 0     | 0     | 94,46                 | -6,88                  | 81,07                  | 0,1631 |
| 10   | -1,68 | 0     | 0     | 246,32                | -18,41                 | 182,57                 | 0,1455 |
| 11   | 0     | +1,68 | 0     | 317,81                | -15,57                 | 252,74                 | 0,1763 |
| 12   | 0     | -1,68 | 0     | 331,65                | 27,56                  | 450,61                 | 0,5749 |
| 13   | 0     | 0     | +1,68 | 741,03                | -9,62                  | 660,10                 | 0      |
| 14   | 0     | 0     | -1,68 | 90,60                 | 17,65                  | 124,24                 | 0,3459 |
| 15   | 0     | 0     | 0     | 154,58                | 13,21                  | 188,21                 | 0,3691 |
| 16   | 0     | 0     | 0     | 159,60                | 9,18                   | 183,45                 | 0,3374 |
| 17   | 0     | 0     | 0     | 152,42                | 7,33                   | 170,93                 | 0,3171 |

Fonte: A autora.

TABELA 5.3 - Matriz de condição

| Respostas              | Objetivo  | Menor valor | Maior valor | Importância |
|------------------------|-----------|-------------|-------------|-------------|
| $\Delta F_{B-C} (\%)$  | Minimizar | 20,12       | 741,03      | 1           |
| $\Delta F_{C-MB} (\%)$ | Maximizar | -41,52      | 45,37       | 3           |
| $\Delta F_{B-MB} (\%)$ | Maximizar | 33,18       | 660,10      | 1           |

Fonte: A autora.

Empregando a EQUAÇÃO 5.1, foi possível observar que a variável de interação entre a concentração de 1-NPP e a concentração de IgG/ALP foi a mais importante. Entretanto, a variável de diluição não apresentou efeitos primários ou de interação significativos ao nível de confiança de 95%, podendo



ser empregada em qualquer nível. Os coeficientes mais significativos ( $b_0$  e  $b_{12}$ ) foram submetidos a um novo cálculo para avaliar a presença de novas réplicas e obter a equação do planejamento.

A partir dos dados do novo planejamento, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Observando os valores  $F_{falta\ de\ ajuste}$  (0,9889) frente ao  $F_{tabelado}$  (4,5502), cuja razão é maior que 10, pode-se afirmar que o modelo não apresentou falta de ajuste – ou seja, a razão entre  $MS_{falta\ de\ ajuste}$  e  $MS_{EP}$  são estatisticamente diferentes. Ademais, a  $MS_{reg}$  e a  $MS_{res}$  se mostraram estatisticamente iguais, com um  $F_{reg}$  (5,0409) >  $F_{tabelado}$  (4,5502), o que indica que a regressão é pouco significativa. O valor de  $R^2$  foi igual a 0,2575, de modo que o modelo pode explicar cerca de 25,75% dos dados no nível e 95% de confiança.

Empregando somente os coeficientes significativos, obteve-se a EQUAÇÃO 5.2:

$$D = b_0 + b_{12}v_1v_2 \quad (\text{EQUAÇÃO 5.2})$$

Por meio de um teste  $t$  com 13 graus de liberdade, verificou-se que os coeficientes  $b_0$  e  $b_{12}$  foram realmente significativos ao nível de confiança de 95%. Assim, foi possível obter a equação para cada modelo individual ajustada para cada resposta. Estão apresentadas as equações de desejabilidade referentes às respostas de  $\Delta F_{B-C}$  (EQUAÇÃO 5.3),  $\Delta F_{C-MB}$  (EQUAÇÃO 5.4) e  $\Delta F_{B-MB}$  (EQUAÇÃO 5.5).

$$D (\Delta F_{B-C}(\%)) = 164,66 - 7,46 * v_1v_2 \quad (\text{EQUAÇÃO 5.3})$$

$$D (\Delta F_{C-MB}(\%)) = 10,34 - 16,94 * v_1v_2 \quad (\text{EQUAÇÃO 5.4})$$

$$D (\Delta F_{B-MB}(\%)) = 191,03 - 45,53 * v_1v_2 \quad (\text{EQUAÇÃO 5.5})$$

### 5.2.2.2 – Otimização das concentrações de IgG/ALP e 1-NPP

Após análise do modelo de regressão, foi construído o gráfico de contorno e de superfície para as variáveis 1 e 2, apresentados na FIGURA 5.6. Como pode ser observado, foi possível identificar duas regiões onde pode-se obter máxima desejabilidade. Assim, podem ser utilizadas: (1) Concentração de 1-NPP = 0,32 mmol L<sup>-1</sup> (valor codificado = -1,68) e concentração de IgG/ALP = 3,68 µg mL<sup>-1</sup> (valor codificado = +1,68); (2) Concentração de 1-NPP = mmol L<sup>-1</sup> (valor codificado = +1,68) e concentração de IgG/ALP = 0,32 µg mL<sup>-1</sup> (valor codificado = -1,68).

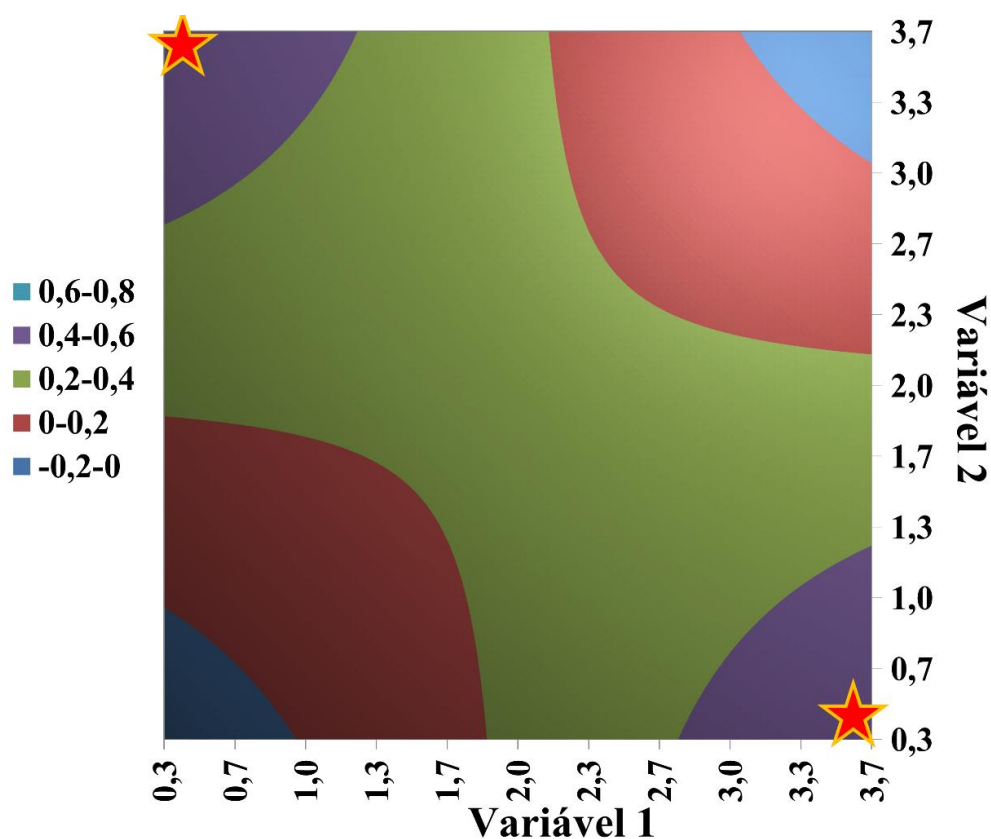


FIGURA 5.6 - Gráfico de contorno referentes à desejabilidade para diferentes concentrações de IgG/ALP e 1-NPP, com condições ótimas indicadas.

Fonte: A autora.

Para a escolha da melhor condição, as duas condições ótimas obtidas pelo planejamento foram avaliadas (FIGURA 5.7A), de modo a observar se não

há comprometimento da qualidade do sinal analítico. Ao utilizar uma concentração baixa de IgG/ALP e alta de 1-NPP (a, em vermelho), é possível observar o aspecto de “pico duplo”, indicando uma perturbação no sistema durante a aquisição do sinal analítico. Esse aspecto pode ser explicado devido à dispersão das moléculas das soluções de detecção durante sua passagem pelo canal, gerando um gradiente de concentração intenso<sup>196</sup>. Já ao utilizar uma concentração alta de IgG/ALP e baixa de 1-NPP (b, em verde), os picos duplos são menos intensos, indicando que concentrações mais altas de substrato diminuem a intensidade deste gradiente de concentração e, conseqüentemente, a perturbação durante a obtenção do sinal analítico. Assim, é possível observar que a qualidade do pico nas condições avaliadas é comprometida.

Deste modo, avaliou-se qual condição apresentava somente um pico de oxidação e que ficasse próximo de uma alta desejabilidade (c, em azul). Assim, as condições de trabalho empregadas foram  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  (valor codificado =  $-1$ ) de 1-NPP e  $3,0 \text{ mg mL}^{-1}$  (valor codificado =  $+1$ ) de IgG/ALP. Na FIGURA 5.7B, é possível observar o gráfico de contorno com a condição escolhida indicada.

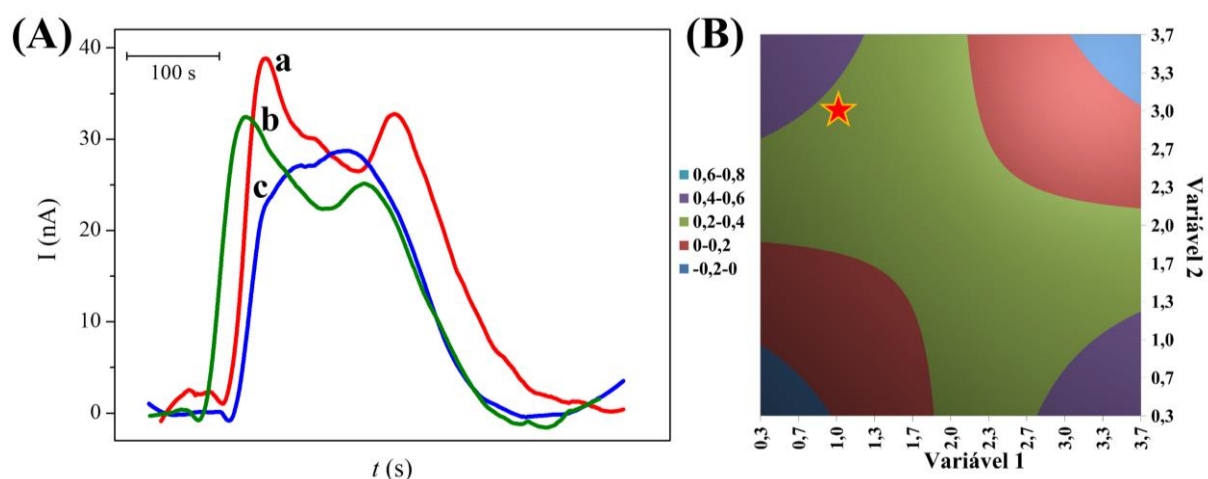


FIGURA 5.7 - (A) Sinais de corrente transiente para: a (●) 1-NPP =  $0,32 \text{ mmol L}^{-1}$  e IgG/ALP =  $3,68 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ; b (●) 1-NPP =  $0,32 \text{ mmol L}^{-1}$  e IgG/ALP =  $0,32 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ; c (●) 1-NPP =  $1,00 \text{ mmol L}^{-1}$  e IgG/ALP =  $3,00 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ . (B) Gráfico de contorno referentes à desejabilidade para diferentes concentrações de IgG/ALP e 1-NPP, com condição escolhida indicada.

Fonte: A autora.

Substituindo os valores escolhidos das variáveis 1 e 2 nas equações, foi determinado os valores previstos para cada resposta nestas condições. Na TABELA 5.4 estão apresentados os valores previstos para resposta nas condições escolhidas e os valores obtidos experimentalmente, bem como o erro relativo entre o previsto e o obtido. O erro relativo referente à resposta  $\Delta F_{B-C}$  (%) foi baixo, mostrando que o valor previsto e obtido foi próximo. Para as respostas  $\Delta F_{C-MB}$  (%) e  $\Delta F_{B-MB}$  (%), o erro relativo foi maior que 46%. Entretanto, considerando que os valores obtidos entre o controle e a amostra apresentam uma diferença significativa, é possível afirmar que estas condições fornecem uma boa diferença entre amostras positivas e negativas, de modo que são adequadas ao objetivo do trabalho.

TABELA 5.4 - Valores previstos, valores experimentais e erro relativo referente às condições utilizadas

| <b>Respostas</b>      | <b>Valor previsto</b> | <b>Valor obtido</b> | <b>Erro relativo (%)</b> |
|-----------------------|-----------------------|---------------------|--------------------------|
| $\Delta F_{B-C}$ (%)  | 172,12                | 168,45              | 2,13                     |
| $\Delta F_{C-MB}$ (%) | 27,27                 | 66,00               | 142,01                   |
| $\Delta F_{B-MB}$ (%) | 236,56                | 345,64              | 46,11                    |

Fonte: A autora.

### 5.2.2.3 – Curva de diluição da amostra

Uma vez que a diluição não foi significativa no planejamento experimental, foi construída uma curva analítica com a mesma amostra MB em diferentes diluições: 1:400 (mais diluída), 1:350, 1:250, 1:100 e 1:50 (menos diluída). Observa-se na FIGURA 5.8A que o sinal de corrente transiente não é linear com o aumento da diluição. Isso indica que há interferência da diluição da amostra na linearidade, de modo que quando esta é mais concentrada (diluições 1:100 e 1:50) há queda do sinal analítico.

A FIGURA 5.8B apresenta a relação entre estas diluições e a resposta obtida pela normalização do sinal de corrente transiente obtida da amostra com

relação à corrente do branco (soro de bezerro). Novamente, o aumento da corrente de pico transitente também indica aumento do valor de  $\Delta F(\%)$ . É possível observar também que há aumento de sinal analítico até 1:250, sendo este o valor máximo obtido neste estudo. Deste modo, optou-se por usar uma diluição de 1:250 para assim obter uma resposta analítica mais exata e sensível nas amostras de soro.

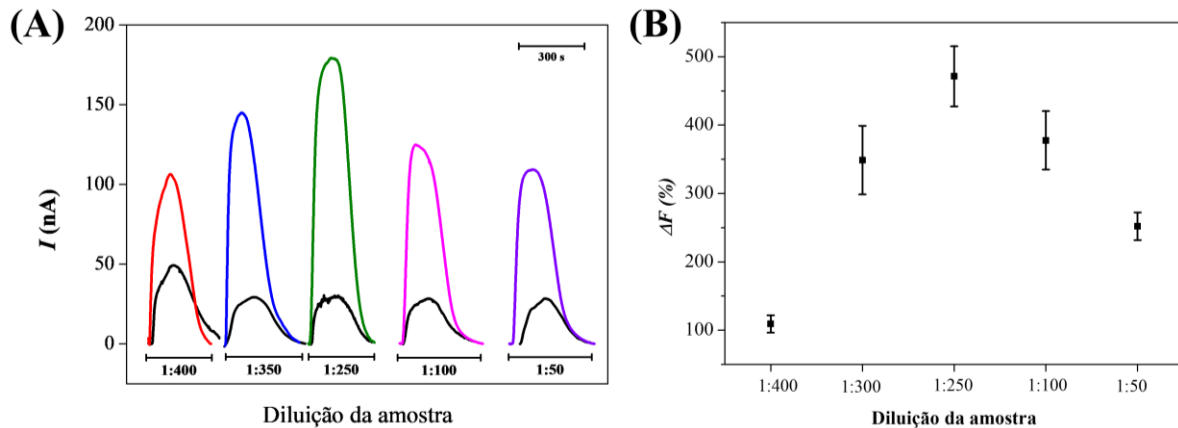


FIGURA 5.8 - (A) Sinais de corrente transitente para diferentes diluições da amostra de soro humano: (●) 1:400; (●) 1:350; (●) 1:250; (●) 1:100; (●) 1:50; (●) branco (soro de bezerro) em cada diluição. (B) Diluição da amostra vs  $\Delta F(\%)$ , calculado a partir da resposta de corrente transitente obtida.

Fonte: A autora.

### 5.2.3 – Precisão do imunoensaio

Os ensaios de precisão foram realizados em três níveis: intradispositivo, intradias e interdias. Os resultados podem ser conferidos na FIGURA 5.9. Comparando com os ensaios de precisão realizados para o imunoensaio desenvolvido com o peptídeo APDDPAWQNFNLR, foi possível observar que o número de *outliers* diminuiu, uma vez que o valor de DPR para 7 réplicas obtidas para um mesmo arranjo foi de 4,8%. Isso indica que o teclado de injeção, além de proporcionar uma resposta analítica mais intensa, também diminui consideravelmente o erro ao eliminar a etapa de aplicação e retropipetagem do ensaio sobre a superfície eletródica. Deste modo, foram

utilizadas 7 réplicas de valores de resposta de corrente transiente de cada arranjo de 8 eletrodos.

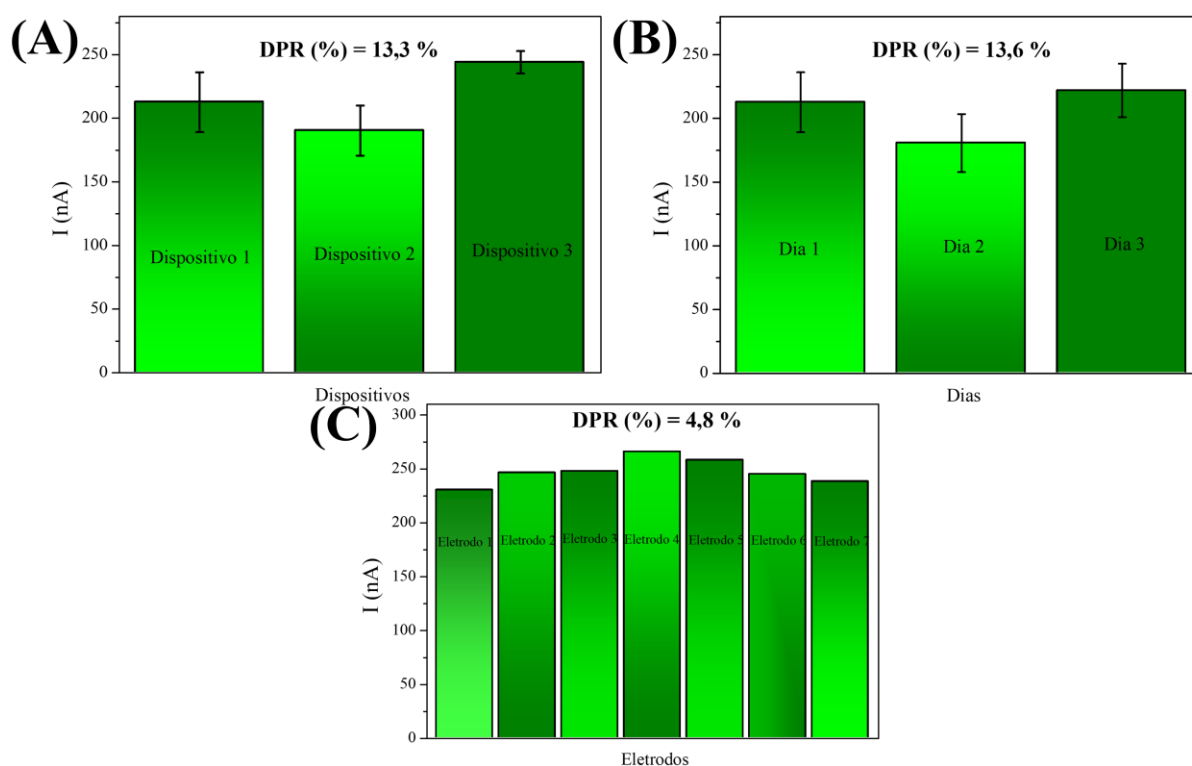


FIGURA 5.9 - Gráfico de barras referente ao estudo de precisão (A) intradias (mesmo dia, dispositivos diferentes); (B) interdias (dias diferentes); (C) 7 eletrodos de um mesmo dispositivo.

Fonte: A autora.

Ademais, o DPR obtido para as análises intra e interdias foi igual a 13,3% e 13,6%, respectivamente. Com valores de DPR abaixo de 15,0%, que é o limite reportado na literatura como aceitável para imunoenaios<sup>187,188</sup>, pode-se concluir que o imunoenasiao desenvolvido apresenta precisão adequada para uso em amostra de soro. Além disso, é preciso salientar que mesmo o DPR da corrente de pico transiente obtida estando dentro dos limites aceitáveis, este valor pode ser ainda mais baixo ao normalizar os resultados (~11,2%).

### 5.2.4 – Desempenho do imunoensaio para diagnóstico sorológico de hanseníase

O imunoensaio foi inicialmente aplicado em uma amostra (diluição 1:250) de cada coorte (saudável, PB e MB) e uma amostra de soro fetal bovino (branco). Os sinais de corrente transiente foram obtidos com a injeção de 100  $\mu\text{L}$  de uma solução de 1,0  $\text{mmol L}^{-1}$  de 1-NPP. Observando a FIGURA 5.10, há diferença de resposta amperométrica entre as amostras hansenianas (PB e MB) e a saudável. Entretanto, não foi possível diferenciar significativamente entre os dois níveis da doença com base na resposta obtida.

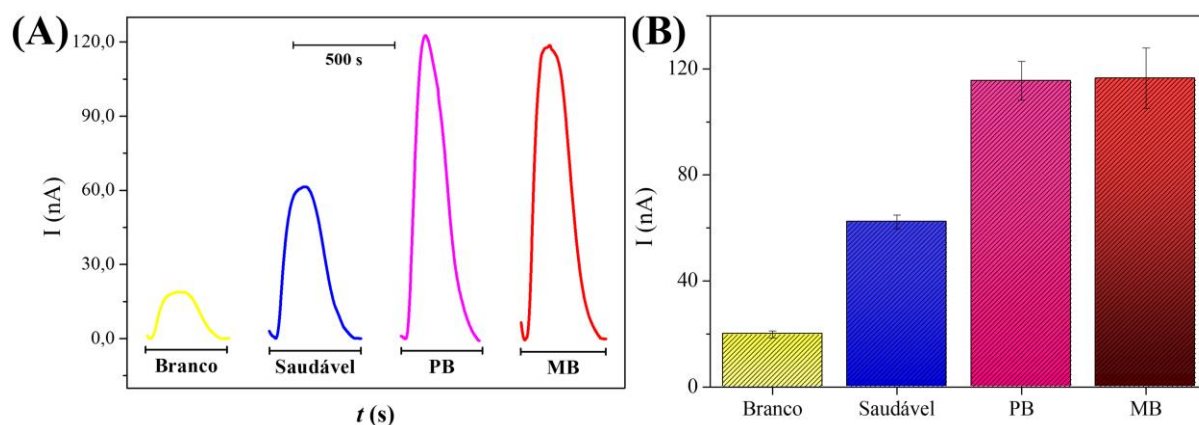


FIGURA 5.10 - (A) Sinal de corrente transiente e (B) gráfico de corrente resultante dos eletrodos de um mesmo arranjo para amostras: (●) soro fetal bovino (branco); (●) indivíduo saudável; (●) PB; (●) MB.

Fonte: A autora.

Em seguida, foram avaliadas 46 amostras de soro divididas entre indivíduos previamente diagnosticados como saudáveis ( $n = 19$ ), PB ( $n = 13$ ) e MB ( $n = 14$ ). Estes resultados foram comparados entre si com base na EQUAÇÃO 4.4, obtendo-se a variação percentual entre o sinal de corrente transiente da amostra analisada e o do branco ( $\Delta F$  (%)). Deste modo, foi avaliada a capacidade do imunoensaio para diferenciar amostras hansenianas das de indivíduos saudáveis, bem como classificar os casos positivos da doença.

Como pode ser observado na FIGURA 5.11, amostras de soro de indivíduos negativos para a doença apresentam valor de  $\Delta F$  (%) menores do que os apresentados por pacientes positivos. Esta diferença é estatisticamente significativa, com  $p < 0,05$ , o que indica a eficiência do imunoensaio. Entretanto, diferente do imunoensaio desenvolvido anteriormente, nota-se que não há diferença entre as amostras de pacientes PB e MB. Isso indica que o ensaio não é capaz de classificar os pacientes positivos, embora seja capaz de identificá-los.

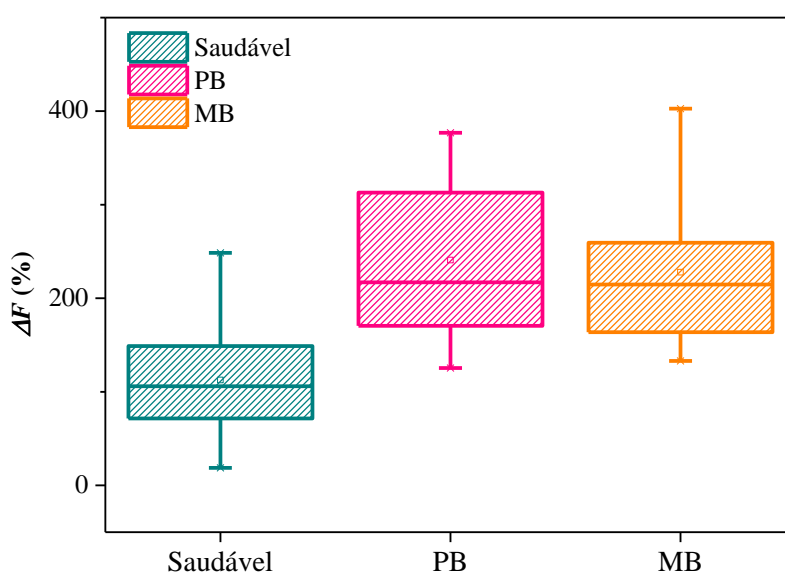


FIGURA 5.11 - Diagrama de caixas para os valores de  $\Delta F$ (%) encontrados para indivíduos (●) saudáveis; (●) pacientes PB; e (●) pacientes MB. ( $p < 0,05$ ).

Fonte: A autora.

Uma curva ROC também foi utilizada para avaliar a sensibilidade e especificidade do imunoensaio (FIGURA 5.12). A curva ROC foi obtida por meio da resposta de  $\Delta F$  (%) para indivíduos negativos para a doença e positivos (PB + MB). O imunoensaio foi capaz de diferenciar amostras hansenianas e não hansenianas com 88,9% de sensibilidade e 78,9% de especificidade para o valor de corte de  $> 148,83\%$ . O valor de AUC igual à 0,8950 indica a eficiência do diagnóstico.



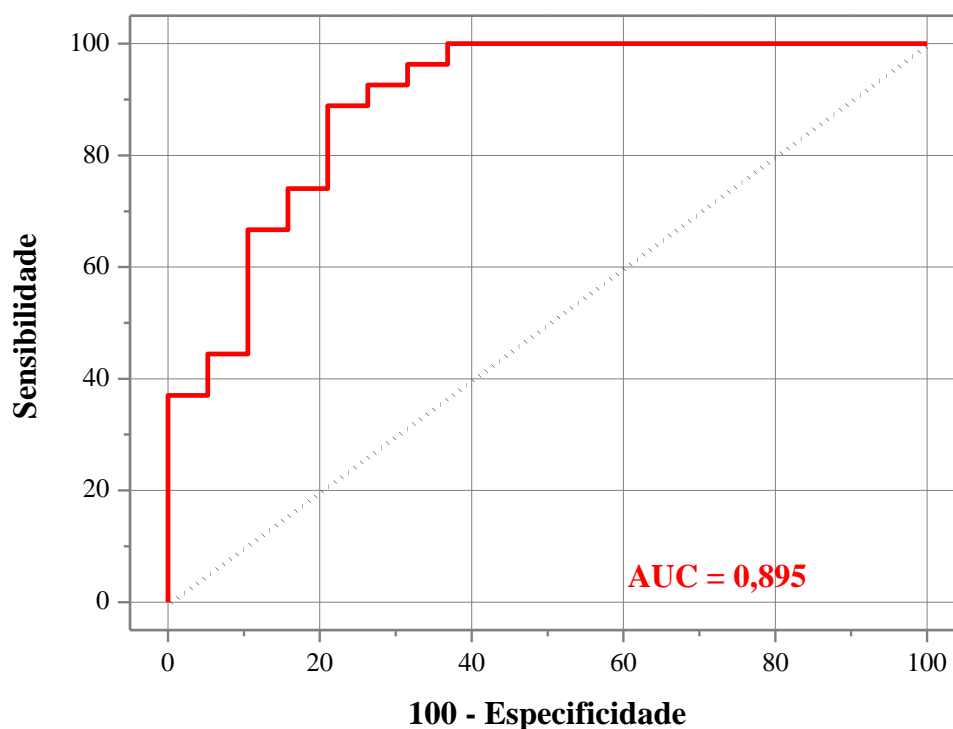


FIGURA 5.12 - Curva ROC para diagnóstico de hanseníase. Resposta de indivíduos saudáveis vs pacientes hansenianos PB + MB.

Fonte: A autora.

A capacidade do imunossensor em diferenciar cada coorte de maneira independente foi avaliada por meio de um diagrama de pontos (FIGURA 5.13), referentes aos resultados obtidos para cada grupo (pontos em eixos verticais), assinalando também o valor de corte (linha horizontal).

Observa-se alta sensibilidade e especificidade para diagnóstico de casos PB (FIGURA 5.13A) e MB (FIGURA 5.13B). Entretanto, a especificidade da diferenciação entre pacientes PB e MB (FIGURA 5.13C) é de apenas 38,5%, não podendo ser considerada significativa<sup>189,190</sup>. Isso indica que o imunoenensaio pode ser aplicado para o diagnóstico de hanseníase (especialmente casos PB), mas não para a classificação dos casos positivos.

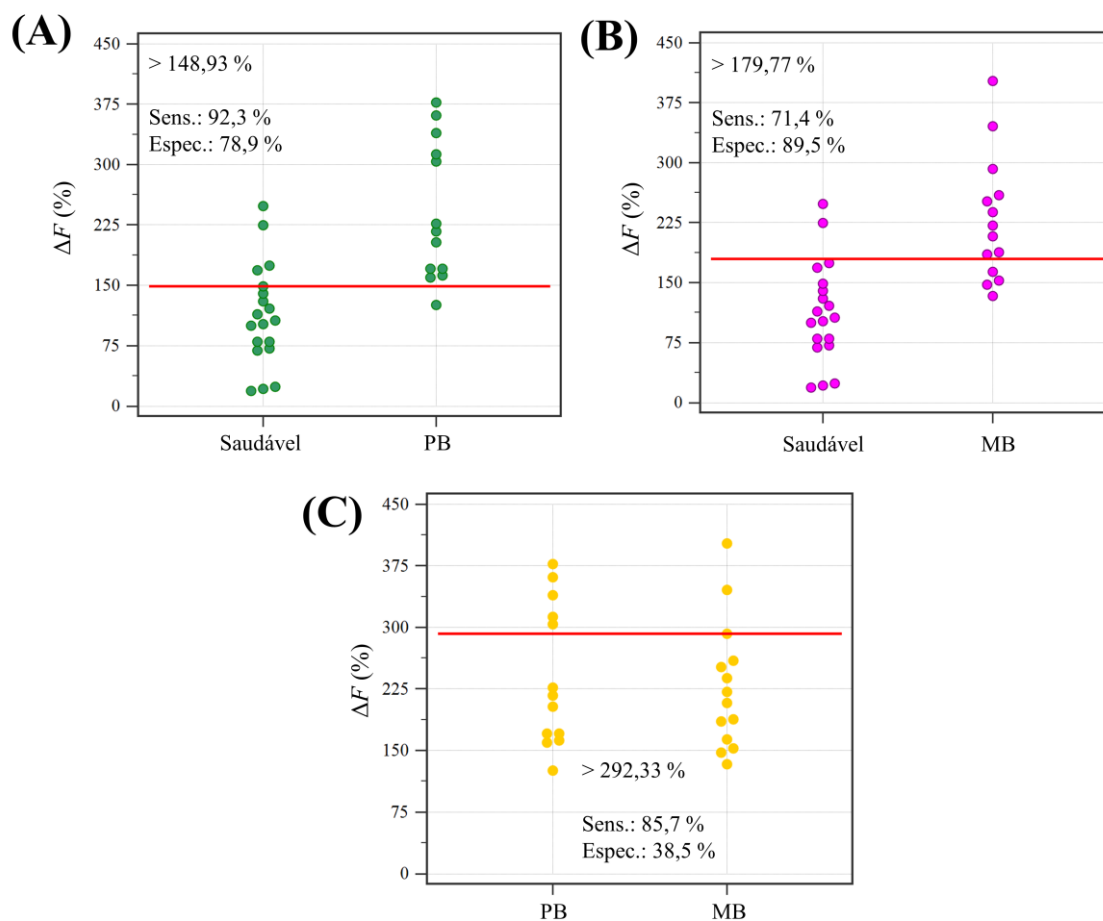


FIGURA 5.13 – Diagrama de pontos para diferentes níveis de hanseníase, avaliados independentemente. (A) saudável (não hansenianos) vs PB; (B) saudável (não hansenianos) vs MB; (C) PB vs MB.

Fonte: A autora.

Além disso, utilizou-se um teste  $t$  para avaliar se a diferença obtida entre os grupos é estatisticamente significativa no nível de 95% de confiança. Conforme indicado na TABELA 5.5, os valores de  $t$  obtidos para a comparação entre amostras PB vs Saudável e MB vs Saudável são maiores que o  $t$  tabelado, bem como os valores de  $p$  são menores que 0,05. Deste modo, o imunoenensaio foi capaz de diferenciar entre as amostras positivas e negativas isoladamente com significância estatística. Entretanto, observa-se que o valor de  $t$  para PB vs MB é menor que o tabelado e que o  $p$  é maior que 0,05. Estes resultados corroboram com o observado na FIGURA 5.13, que aponta que o ensaio não é capaz de distinguir entre as coortes positivas da doença.

TABELA 5.5 - Análise da significância estatística das diferenças de resposta entre diferentes grupos individualmente

|                            | <b>Saudável vs<br/>Hanseniano</b> | <b>PB vs<br/>Saudável</b> | <b>MB vs<br/>Saudável</b> | <b>PB vs<br/>MB</b> |
|----------------------------|-----------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------|
| <b>Valor de corte</b>      | >148,93%                          | >148,93%                  | >179,77%                  | >292,33%            |
| <b>Sensibilidade</b>       | 88,9%                             | 92,3%                     | 71,4%                     | 85,7%               |
| <b>Especificidade</b>      | 78,9%                             | 78,9%                     | 89,5%                     | 38,5%               |
| <b><i>p</i></b>            | < 0,0001                          | < 0,0001                  | < 0,0001                  | 0,779               |
| <b><i>t</i> calculado*</b> | 5,471                             | 4,854                     | 4,691                     | 0,407               |
| <b><i>t</i> tabelado*</b>  | 2,015                             | 2,042                     | 2,040                     | 2,059               |

\* 95% de confiança. Fonte: A autora.

### 5.3 – Considerações parciais

Um magneto-imunoensaio foi desenvolvido utilizando o peptídeo SGLSQVTGLFGVPGL para captura de anticorpos anti-*M. leprae*. Utilizou-se um dispositivo microfluídico descartável para a análise eletroquímica e, para captura do imunoensaio na superfície eletródica, um teclado de injeção. Frente ao método manual de pipetagem (utilizado no ensaio anterior), o uso do teclado de injeção proporcionou resposta de corrente transiente mais intensa e mais precisa.

Um planejamento experimental com múltiplas respostas forneceu as condições ótimas do imunoensaio (concentração de IgG/ALP e de 1-NPP). Além disso, observou-se também que a diluição da amostra não apresenta resposta linear. Deste modo, para o restante do trabalho, optou-se por utilizar a amostra menor diluída (1:250), que apresentou maior resposta eletroquímica.

Utilizando estas condições, o imunoensaio foi avaliado em amostras de soro humano. A precisão apresentada pelos ensaios foi alta, com valores de DPR (%) abaixo de 15%. Ao avaliar cada coorte, observou-se que as amostras saudáveis apresentam sinal analítico menos intenso que o das amostras hansenianas. Essa diferença é estatisticamente significativa no nível de 95% de confiança. Observou-se, também, que não houve diferença significativa entre as

coortes positivas, de modo que não é eficiente para a classificação de casos positivos.

Por meio da curva ROC e dos diagramas de pontos, observou-se que o diagnóstico de hanseníase pode ser realizado utilizando o magneto-imunoensaio desenvolvido, obtendo alta especificidade e sensibilidade. Embora não seja indicado para a classificação (sem diferença estatisticamente significativa no nível de 95%), é importante ressaltar que o imunoensaio foi capaz de identificar com eficiência os casos positivos, inclusive os PB, que atualmente são o grande desafio para o diagnóstico de hanseníase.

# ***CONCLUSÕES***

## ***Capítulo 6***

## 6 - CONCLUSÕES

Neste trabalho, foram desenvolvidos dois magneto-imunoensaios para diagnóstico sorológico de hanseníase. A captura dos anticorpos específicos foi realizada com peptídeos sintéticos, mapeados de proteínas consideradas biomarcadores estabelecidos na literatura. Utilizou-se um sistema microfluídico e células eletroquímicas capazes de realizar até 8 réplicas simultâneas, com resultados obtidos por amperometria.

Para a detecção, utilizou-se um dispositivo microfluídico descartável, construído com materiais de baixo custo e fácil acesso. O dispositivo foi composto por eletrodos SPCE, construídos por meio da técnica de serigrafia. A construção destes eletrodos pode ser considerada robusta, com pouca variação de sinal de  $I_p$  frente à pequenas alterações das condições padrão. Além disso, apresentaram boa estabilidade com o decorrer de 70 dias, com ligeira variação entre os valores de  $I_p$ . Em 23 semanas, porém, observou-se queda no sinal de  $I_p$  a partir da semana 7, indicando perda de condutividade do eletrodo.

Os peptídeos utilizados para captura específica de anticorpos anti-*M. leprae*, APDDPAWQNIFNLRR e SGLSQVTGLFGVPGL, apresentaram boa reatividade, com diferença significativa entre amostra positiva e negativa para hanseníase na avaliação via QCM. O peptídeo  ${}_{24}\text{QAKTFLDKFNHEAEDLFYQ}_{42}\text{C}$  foi avaliado como controle negativo e não diferenciou a amostra positiva da negativa.

O magneto-imunoensaio desenvolvido com o peptídeo APDDPAWQNIFNLRR foi avaliado em amostras de soro humano. A ancoragem do peptídeo às PMs foi considerada eficiente e as condições experimentais ótimas do ensaio foram obtidas por um planejamento experimental. A curva de diluição indicou que relação linear entre  $\Delta F(\%)$  e concentração de anticorpos anti-*M. leprae*. A precisão dos ensaios apresentou valores de DPR (%) abaixo de 15%, indicando boa reprodutibilidade.

Ao avaliar cada coorte, observou-se diferença de resposta entre elas, sendo estatisticamente significativa no nível de 95% de confiança. A curva ROC e os diagramas de pontos construídos com análise das amostras de soro indicam a eficiência do diagnóstico da doença. Além disso, observou-se que o imunoenensaio também é eficiente em classificar a doença, diferenciando claramente os pacientes PB dos MB por meio do título de anticorpos. Assim, o diagnóstico e classificação da hanseníase pode ser realizado utilizando o magneto-imunoenensaio desenvolvido, com alta especificidade e sensibilidade.

O magneto-imunoenensaio desenvolvido com o peptídeo SGLSQVTGLFGVPGL foi avaliado em amostras de soro humano. Utilizou-se um teclado de injeção para captura do imunoenensaio na superfície eletródica, o que proporcionou resposta de corrente transiente mais intensa e mais precisa do que o método utilizado no ensaio anterior (pipeta). Um planejamento experimental com múltiplas respostas forneceu as condições ótimas do imunoenensaio (concentração de IgG/ALP e de 1-NPP). Além disso, observou-se que a diluição da amostra não apresenta resposta linear. A precisão dos ensaios apresentou valores de DPR (%) abaixo de 15%, indicando boa reprodutibilidade. Em especial, a precisão do dispositivo (7 eletrodos) apresentou um DPR (%) baixo, resultado do uso do teclado de injeção.

Ao avaliar cada coorte, observou-se que as amostras saudáveis apresentam sinal analítico menos intenso que o das amostras hansenianas, sendo estatisticamente significativa no nível de 95% de confiança. O imunoenensaio foi capaz de identificar os pacientes positivos, entretanto, não houve diferença significativa entre as coortes positivas, de modo que não é eficiente para a classificação. Mesmo assim, curva ROC e os diagramas de pontos indicam que o diagnóstico de hanseníase pode ser realizado utilizando o magneto-imunoenensaio desenvolvido com alta especificidade e sensibilidade.

Deste modo, os imunoenensaio desenvolvidos apresentaram uma excelente capacidade discriminatória entre pacientes positivos e negativos, sendo

capazes até mesmo de identificar pacientes PB com alta sensibilidade, especificidade e precisão. Assim, apresentam potencial para orientar o tratamento adequado, melhorando a qualidade de vida dos pacientes. Métodos simples de diagnóstico podem contribuir significativamente para a queda de novos casos e futuramente até para eliminação da doença.



## REFERÊNCIAS

1. MARTINS, A. C. C.; CASTRO, J. de C. e; & MOREIRA, J. S. “Estudo Retrospectivo de Dez Anos Em Endoscopia Das Cavidades Nasais de Pacientes Com Hanseníase.” *Rev. Bras. Otorrinolaringol.*, 71 (5): 609, 2006.
2. FROES, L. A. R.; TRINDADE, M. A. B.; & SOTTO, M. N. “Immunology of Leprosy.” *Int. Rev. Immunol.*, 41 (2): 72, 2022.
3. PLOEMACHER, T.; FABER, W. R.; MENKE, H.; RUTTEN, V.; & PIETERS, T. “Reservoirs and Transmission Routes of Leprosy; A Systematic Review.” *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 14 (4): 1, 2020.
4. ORGANIZATION, W. H. Thirteenth Meeting of the WHO Strategic and Technical Advisory Group for Neglected Tropical Diseases, 15-17 September 2020. 2020.
5. RAMOS, A. C. V.; ALONSO, J. B.; BERRA, T. Z.; ALVES, L. S.; MARTORELI JÚNIOR, J. F.; SANTOS, F. L. dos; ALVES, Y. M.; ANDRADE, H. L. P. de; COSTA, F. B. P. da; CRISPIM, J. de A.; YAMAMURA, M.; ALVES, J. D.; SANTOS NETO, M.; FUENTEALBA-TORRES, M.; PINTO, I. C.; & ARCÊNCIO, R. A. “Social Inequalities and Their Association with the Leprosy Burden in a Brazilian City of Low Endemicity: An Ecological Study.” *Acta Trop.*, 218: 105884, 2021.
6. WORLD HEALTH ORGANIZATION. “A Guide to Leprosy Control.Pdf.” Geneva, World Health Organization, 1988, p. 121.
7. SCHUENEMANN, V. J.; & SI. “Genome-Wide Comparison of Medieval and Modern Mycobacterium Leprae.” *341 (2013): 179*, 2014.
8. ROBERTSON, J. *Leprosy, Historical.*, Second Edia ed. Elsevier, 2016. Vol. 4.
9. EIDT, L. M. “Breve História Da Hanseníase: Sua Expansão Do Mundo Para as Américas, o Brasil e o Rio Grande Do Sul e Sua Trajetória Na Saúde Pública Brasileira.” *Saúde e Soc.*, 13 (2): 76, 2004.
10. OPROMOLLA, D. V. A. *Noções de Hansenologia.*, 1a ed. Bauru, Centro de Estudos Dr. Reynaldo Quagliato, 2000.
11. CUNHA, V. da S. “Isolados ‘como Nós’ Ou Isolados ‘Entre Nós’?: A Polêmica Na Academia Nacional de Medicina Sobre o Isolamento Compulsório Dos Doentes de Lepra.” *História, Ciências, Saúde-Manguinhos*, 17 (4): 939, 2010.
12. SCHREUDER, P. A. M.; NOTO, S.; & RICHARDUS, J. H. “Epidemiologic Trends of Leprosy for the 21st Century.” *Clin. Dermatol.*, 34 (1): 24, 2016.
13. WORLD HEALTH ORGANIZATION. “WHO Expert Committee on Leprosy.” *World Health Organ. Tech. Rep. Ser.*, No. 9682012.
14. GOULART, I. M. B.; & GOULART, L. R. “Leprosy: Diagnostic and Control Challenges for a Worldwide Disease.” *Arch. Dermatol. Res.*, 300

- (6): 269, 2008.
15. BRASIL: MINISTÉRIO DA SAÚDE. Guia Prático Sobre a Hanseníase., 1a ed. Brasília, Editora do Ministério da Saúde, 2017.
  16. BRITTON, W. J.; & LOCKWOOD, D. N. J. “Leprosy.” *Lancet*, 363 (9416): 1209, 2004.
  17. BARBIERI, R. R.; XU, Y.; SETIAN, L.; SOUZA-SANTOS, P. T.; TRIVEDI, A.; CRISTOFONO, J.; BHERING, R.; WHITE, K.; SALES, A. M.; MILLER, G.; NERY, J. A. C.; SHARMAN, M.; BUMANN, R.; ZHANG, S.; GOLDUST, M.; SARNO, E. N.; MIRZA, F.; CAVALIERO, A.; TIMMER, S.; BONFIGLIOLI, E.; SMITH, C.; SCOLLARD, D.; NAVARINI, A. A.; AERTS, A.; FERRES, J. L.; & MORAES, M. O. “Reimagining Leprosy Elimination with AI Analysis of a Combination of Skin Lesion Images with Demographic and Clinical Data.” *Lancet Reg. Heal. - Am.*, 9: 100192, 2022.
  18. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). “Global Leprosy (Hansen Disease) Update, 2020: Impact of COVID-19 on Global Leprosy Control.” *Wkly. Epidemiol. Rec.*, 96 (36): 421, 2020.
  19. WORLD HEALTH ORGANIZATION. “Global Leprosy Update, 2018: Moving towards a Leprosy.” *Wkly. Epidemiol. Rec.*, 94 (August 2019): 389, 2019.
  20. BRASIL: MINISTÉRIO DA SAÚDE. “Boletim Epidemiológico Hanseníase 2020.” *Bol. Epidemiológico Hansen.*, Jan: 52, 2020.
  21. BRASIL: MINISTÉRIO DA SAÚDE. “Boletim Epidemiológico - Hanseníase.” 2022.
  22. NERY, J. S.; RAMOND, A.; PESCARINI, J. M.; ALVES, A.; STRINA, A.; ICHIHARA, M. Y.; FERNANDES PENNA, M. L.; SMEETH, L.; RODRIGUES, L. C.; BARRETO, M. L.; BRICKLEY, E. B.; & PENNA, G. O. “Socioeconomic Determinants of Leprosy New Case Detection in the 100 Million Brazilian Cohort: A Population-Based Linkage Study.” *Lancet Glob. Heal.*, 7 (9): e1226, 2019.
  23. GASCHIGNARD, J.; GRANT, A. V.; THUC, N. Van; ORLOVA, M.; COBAT, A.; HUONG, N. T.; BA, N. N.; THAI, V. H.; ABEL, L.; SCHURR, E.; & ALCAÏS, A. “Pauci- and Multibacillary Leprosy: Two Distinct, Genetically Neglected Diseases.” *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 10 (5): 1, 2016.
  24. DEPS, P.; & CRUZ, A. “Why We Should Stop Using the Word Leprosy.” *Lancet Infect. Dis.*, 20 (4): e75, 2020.
  25. SOMAR, P.; WALTZ, M.; & VAN BRAKEL, W. “The Impact of Leprosy on the Mental Wellbeing of Leprosy-Affected Persons and Their Family Members – a Systematic Review.” *Glob. Ment. Heal.*, 7: e15, 2020.
  26. BRASIL. Lei N° 9.010, de 29 de Março de 1995. Dispõe Sobre a Terminologia Oficial Relativa à Hanseníase e Dá Outras Providências. 1995.
  27. VAN BRAKEL, W. H.; PETERS, R. M.; & DA SILVA PEREIRA, Z. B.

- “Stigma Related to Leprosy — A Scientific View.” *Int. Textb. Lepr.*, No. 1: 1, 2019.
28. DELBONI, L.; & DEPS, P. “Consensus in Brazil on the Renaming of Leprosy to Hansen’s Disease.” *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 115 (9): 1086, 2021.
  29. BASOMBRI, B, COCHRANE, RG, PRIETO, JG, KHANOLKAR, VR, KITAMURA, K, LATAPI, F, RABELLO, FEA, VEGAS, M, WADE, HW, ARNOLD, H. “Classificação de Lepra - Madri, 1953.” *Rev. Bras. Leprol.*, No. 1946: 75, 1953.
  30. SCOLLARD, D. M.; ADAMS, L. B.; GILLIS, T. P.; KRAHENBUHL, J. L.; TRUMAN, R. W.; & WILLIAMS, D. L. “The Continuing Challenges of Leprosy.” *Clin. Microbiol. Rev.*, 19 (2): 338, 2006.
  31. ARAÚJO, M. G. “Hanseníase No Brasil.” *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 36 (3): 373, 2003.
  32. BRASIL: MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Guia de Procedimentos Técnicos: Baciloscopia Em Hanseníase.*, 1a ed. Brasília, Editora do Ministério da Saúde, 2010.
  33. VIDAL, A. M. B.; & CATAPANI, W. R. “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Immunoassaying versus Microscopy: Advantages and Drawbacks for Diagnosing Giardiasis.” *Sao Paulo Med. J.*, 123 (6): 282, 2005.
  34. Item 011 - Fotomicrografia de Hanseníase  
<http://basearch.coc.fiocruz.br/index.php/fotomicrografia-de-hansenia-se-10>.
  35. Item 014 - Fotomicrografia de Hanseníase  
<http://basearch.coc.fiocruz.br/index.php/fotomicrografia-de-hansenia-se-13>.
  36. RODRIGUES DAXBACHER, E. L.; CABRERA PEREIRA, J. P.; RAMOS DE OLIVEIRA, S.; DUARTE TORTELLY, V.; CARNEIRO, S.; & JEUNON, T. “The Importance of the Biopsy Technique in the Diagnosis of Histoid Leprosy.” *Am. J. Dermatopathol.*, 42 (2): 125, 2020.
  37. SPITZ, C. N.; MOGAMI, R.; PITTA, I. J. R.; HACKER, M. A. V. B.; SALES, A. M.; SARNO, E. N.; & JARDIM, M. R. “Ultrasonography as a Diagnostic Tool for Neural Pain in Leprosy.” *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 16 (4): e0010393, 2022.
  38. RUSYATI, L. M. M.; SASMITA, P. A.; & ADIGUNA, M. S. “Diagnostic Test Using Monofilament Compared to Electroneuromyography (ENMG) for Detection of Peripheral Neuropathy in Leprosy at Sanglah General Hospital, Bali-Indonesia.” *Bali Med. J.*, 8 (3): 902, 2019.
  39. BRASIL, M. da S. “Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas Da Hanseníase.” *Portaria SCTIE/MS N°67*, 7 julho 2022, : 1, 2022.
  40. VAN HOOIJ, A.; VAN DEN EEDEN, S. J. F.; KHATUN, M.; SOREN, S.; FRANKEN, K. L. M. C.; CHANDRA ROY, J.; ALAM, K.; CHOWDHURY, A. S.; RICHARDUS, J. H.; & GELUK, A. “BCG-Induced Immunity Profiles in Household Contacts of Leprosy Patients Differentiate between Protection and Disease.” *Vaccine*, 39 (50): 7230,

- 2021.
41. MERLE, C. S.; CUNHA, S. S.; & RODRIGUES, L. C. “BCG Vaccination and Leprosy Protection: Review of Current Evidence and Status of BCG in Leprosy Control.” *Expert Rev. Vaccines*, 9 (2): 209, 2010.
  42. TORRES, R. T.; FACHI, M. M.; BÖGER, B.; MARSON, B. M.; FERREIRA, V. L.; PONTAROLO, R.; & GUIMARÃES, T. M. “Sensitivity and Specificity of Multibacillary and Paucibacillary Leprosy Laboratory Tests: A Systematic Review and Meta-Analysis.” *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 100: 115337, 2021.
  43. BRASIL: MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria SCTIE/MS N° 78, de 31 de Dezembro de 2021.
  44. SOPER, S. A.; BROWN, K.; ELLINGTON, A.; FRAZIER, B.; GARCIA-MANERO, G.; GAU, V.; GUTMAN, S. I.; HAYES, D. F.; KORTE, B.; LANDERS, J. L.; LARSON, D.; LIGLER, F.; MAJUMDAR, A.; MASCINI, M.; NOLTE, D.; ROSENZWEIG, Z.; WANG, J.; & WILSON, D. “Point-of-Care Biosensor Systems for Cancer Diagnostics/Prognostics.” *Biosens. Bioelectron.*, 21 (10): 1932, 2006.
  45. MAHANAMA, A.; & WILSON-DAVIES, E. “Insight into PCR Testing for Surgeons.” *Surg.*, 39 (11): 759, 2021.
  46. CONTIN, L. A.; ALVES, C. J. M.; FOGAGNOLO, L.; NASSIF, P. W.; BARRETO, J. A.; LAURIS, J. R. P.; & NOGUEIRA, M. E. “Uso Do Teste ML-Flow Como Auxiliar Na Classificação e Tratamento Da Hanseníase.” *An. Bras. Dermatol.*, 86 (1): 91, 2011.
  47. BÜHRER-SÉKULA, S.; SMITS, H. L.; GUSSENHOVEN, G. C.; VAN LEEUWEN, J.; AMADOR, S.; FUJIWARA, T.; KLATSER, P. R.; & OSKAM, L. “Simple and Fast Lateral Flow Test for Classification of Leprosy Patients and Identification of Contacts with High Risk of Developing Leprosy.” *J. Clin. Microbiol.*, 41 (5): 1991, 2003.
  48. ANDRADE, A. R. C. de; GROSSI, M. A. de F.; BÜHRER-SÉKULA, S.; & ANTUNES, C. M. F. “Soroprevalência Do Teste ML Flow Em Contatos de Hanseníase de Minas Gerais.” *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 41 (suppl 2): 56, 2008.
  49. ARUNAGIRI, K.; SANGEETHA, G.; SUGASHINI, P. K.; BALARAMAN, S.; & SHOWKATH ALI, M. K. “Nasal PCR Assay for the Detection of Mycobacterium Leprae Pra Gene to Study Subclinical Infection in a Community.” *Microb. Pathog.*, 104: 336, 2017.
  50. PARKASH, O.; SINGH, H. B.; RAI, S.; PANDEY, A.; KATOCH, V. M.; & GIRDHAR, B. K. “Detection of Mycobacterium Leprae DNA for 36kDa Protein in Urine from Leprosy Patients: A Preliminary Report.” *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, 46 (5): 275, 2004.
  51. LI, H.-Y.; WEN, Y.; LIU, J.; ZHANG, Y.; XING, Y.; & YUAN, L.-C. “Whole-Blood Nested-PCR Amplification of M. Leprae-Specific DNA for Early Diagnosis of Leprosy.” *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 88 (5): 918, 2013.
  52. BARRETO DA SILVEIRA, I. G. de O.; DA SILVA NETO, J. A.; DA

- SILVA FERREIRA, J.; SILVA, T. S.; & HOLANDA, I. S. A. "Detection of Mycobacterium Leprae DNA in Clinical and Environmental Samples Using Serological Analysis and PCR." *Mol. Biol. Rep.*, 48 (10): 6887, 2021.
53. DA ROSA, F. B.; DE SOUZA, V. C.; DE ALMEIDA, T. A. P.; DO NASCIMENTO, V. A.; VÁSQUEZ, F. G.; CUNHA, M. da G. S.; & NAVECA, F. G. "Detection of Mycobacterium Leprae in Saliva and the Evaluation of Oral Sensitivity in Patients with Leprosy." *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 108 (5): 572, 2013.
  54. AZEVEDO, M. de C. S.; RAMUNO, N. M.; FACHIN, L. R. V.; TASSA, M.; ROSA, P. S.; BELONE, A. de F. F.; DIÓRIO, S. M.; SOARES, C. T.; GARLET, G. P.; & TROMBONE, A. P. F. "QPCR Detection of Mycobacterium Leprae in Biopsies and Slit Skin Smear of Different Leprosy Clinical Forms." *Brazilian J. Infect. Dis.*, 21 (1): 71, 2017.
  55. MARUYAMA, F. H.; MORGADO, T. O.; PACHECO, R. C.; NAKAZATO, L.; & DUTRA, V. "Molecular Detection of Mycobacterium Leprae by Polymerase Chain Reaction in Captive and Free-Ranging Wild Animals." *Brazilian J. Infect. Dis.*, 22 (5): 445, 2018.
  56. GURUNG, P.; GOMES, C. M.; VERNAL, S.; & LEEFLANG, M. M. G. "Diagnostic Accuracy of Tests for Leprosy: A Systematic Review and Meta-Analysis." *Clin. Microbiol. Infect.*, 25 (11): 1315, 2019.
  57. PAULA VAZ CARDOSO, L.; DIAS, R. F.; FREITAS, A. A.; HUNGRIA, E. M.; OLIVEIRA, R. M.; COLLOVATI, M.; REED, S. G.; DUTHIE, M. S.; & MARTINS ARAÚJO STEFANI, M. "Development of a Quantitative Rapid Diagnostic Test for Multibacillary Leprosy Using Smart Phone Technology." *BMC Infect. Dis.*, 13 (1): 497, 2013.
  58. DUTHIE, M. S.; BALAGON, M. F.; MAGHANOY, A.; ORCULLO, F. M.; CANG, M.; DIAS, R. F.; COLLOVATI, M.; & REED, S. G. "Rapid Quantitative Serological Test for Detection of Infection with Mycobacterium Leprae, the Causative Agent of Leprosy." *J. Clin. Microbiol.*, 52 (2): 613, 2014.
  59. ENGVALL, E.; & PERLMANN, P. "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Quantitative Assay of Immunoglobulin G." *Immunochemistry*, 8 (9): 871, 1971.
  60. GURUNG, P.; GOMES, C. M.; VERNAL, S.; & LEEFLANG, M. M. G. "Diagnostic Accuracy of Tests for Leprosy: A Systematic Review and Meta-Analysis." *Clin. Microbiol. Infect.*, 25 (11): 1315, 2019.
  61. DE OLIVEIRA, A. L. G.; FRAGA, V. G.; SERNIZON-GUIMARÃES, N.; CARDOSO, M. S.; VIANA, A. G.; BUENO, L. L.; BARTHOLOMEU, D. C.; DA SILVA MENEZES, C. A.; & FUJIWARA, R. T. "Diagnostic Accuracy of Tests Using Recombinant Protein Antigens of Mycobacterium Leprae for Leprosy: A Systematic Review." *J. Infect. Public Health*, 13 (8): 1078, 2020.
  62. DUTHIE, M. S.; RAYCHAUDHURI, R.; TUTTERROW, Y. L.;

- MISQUITH, A.; BOWMAN, J.; CASEY, A.; BALAGON, M. F.; MAGHANOY, A.; BELTRAN-ALZATE, J. C.; ROMERO-ALZATE, M.; CARDONA-CASTRO, N.; & REED, S. G. "A Rapid ELISA for the Diagnosis of MB Leprosy Based on Complementary Detection of Antibodies against a Novel Protein-Glycolipid Conjugate." *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 79 (2): 233, 2014.
63. PIERNEEF, L.; VAN HOOIJ, A.; TAAL, A.; RUMBAUT, R.; NOBRE, M. L.; VAN BRAKEL, W.; & GELUK, A. "Detection of Anti-M. Leprae Antibodies in Children in Leprosy-Endemic Areas: A Systematic Review." *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 15 (8): e0009667, 2021.
64. CHEN, P.-Y.; KO, C.-H.; WANG, C. J.; CHEN, C.-W.; CHIU, W.-H.; HONG, C.; CHENG, H.-M.; & WANG, I.-J. "The Early Detection of Immunoglobulins via Optical-Based Lateral Flow Immunoassay Platform in COVID-19 Pandemic." *PLoS One*, 16 (7): e0254486, 2021.
65. RHOUATI, A.; TENIOU, A.; BADEA, M.; & MARTY, J. L. "Analysis of Recent Bio-/Nanotechnologies for Coronavirus Diagnosis and Therapy." *Sensors (Basel)*, 21 (4): 1485, 2021.
66. TORRES, R. T.; FACHI, M. M.; BÖGER, B.; MARSON, B. M.; FERREIRA, V. L.; PONTAROLO, R.; & GUIMARÃES, T. M. "Sensitivity and Specificity of Multibacillary and Paucibacillary Leprosy Laboratory Tests: A Systematic Review and Meta-Analysis." *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 100 (2)2021.
67. HORNS, F.; DEKKER, C. L.; & QUAKE, S. R. "Memory B Cell Activation, Broad Anti-Influenza Antibodies, and Bystander Activation Revealed by Single-Cell Transcriptomics." *Cell Rep.*, 30 (3): 905, 2020.
68. CLEM, A. S. "Fundamentals of Vaccine Immunology." *J. Glob. Infect. Dis.*, 3 (1): 73, 2011.
69. HAN, Y.; GAO, H.; XU, J.; LUO, J.; HAN, B.; BAO, J.; PAN, G.; LI, T.; & ZHOU, Z. "Innate and Adaptive Immune Responses Against Microsporidia Infection in Mammals." *Front. Microbiol.*, 11 (June): 1, 2020.
70. SCHROEDER, H. W.; & CAVACINI, L. "Structure and Function of Immunoglobulins." *J. Allergy Clin. Immunol.*, 125 (2 SUPPL. 2): S41, 2010.
71. BOWEN, A.; & CASADEVALL, A. *The Role of the Constant Region in Antibody-Antigen Interactions: Redefining the Modular Model of Immunoglobulin Structure*. Elsevier Inc., 2018.
72. BEENHOUWER, D. O. *Molecular Basis of Diseases of Immunity*., Second Edia ed. Elsevier Inc., 2018.
73. TSO, F. Y.; LIDENGE, S. J.; POPPE, L. K.; PEÑA, P. B.; PRIVATT, S. R.; BENNETT, S. J.; NGOWI, J. R.; MWAISELAGE, J.; BELSHAN, M.; SIEDLIK, J. A.; RAINE, M. A.; OCHOA, J. B.; GARCIA-DIAZ, J.; NOSSAMAN, B.; BUCKNER, L.; ROBERTS, W. M.; DEAN, M. J.; OCHOA, A. C.; WEST, J. T.; & WOOD, C. "Presence of Antibody-

- Dependent Cellular Cytotoxicity (ADCC) against SARS-CoV-2 in COVID-19 Plasma.” *PLoS One*, 16 (3 March): 1, 2021.
74. KELLIE, S.; & AL-MANSOUR, Z. *Overview of the Immune System*. Elsevier Inc., 2017.
  75. LABUDA, J.; BOWATER, R. P.; FOJTA, M.; GAUGLITZ, G.; GLATZ, Z.; HAPALA, I.; HAVLIŠ, J.; KILAR, F.; KILAR, A.; MALINOVSKÁ, L.; SIRÉN, H. M. M.; SKLÁDAL, P.; TORTA, F.; VALACHOVIČ, M.; WIMMEROVÁ, M.; ZDRÁHAL, Z.; & HIBBERT, D. B. “Terminology of Bioanalytical Methods (IUPAC Recommendations 2018).” *Pure Appl. Chem.*, 90 (7): 1121, 2018.
  76. HIGSON, S. P. J. “Introdução Aos Biossensores.” IN: *Química Analítica*. São Paulo, McGraw-Hill, 2009. p. 392–399.
  77. CRESPILO, F. N. *Advances in Bioelectrochemistry Volume 4*. 2022. Vol. 5.
  78. OGUNGBILE, A. O.; ASHUR, I.; ICIN, I.; SHAPIRO, O. H.; & VERNICK, S. “Rapid Detection and Quantification of Microcystins in Surface Water by an Impedimetric Immunosensor.” *Sensors Actuators B Chem.*, 348 (August): 130687, 2021.
  79. LIU, L.; XU, D.; HU, Y.; LIU, S.; WEI, H.; ZHENG, J.; WANG, G.; HU, X.; & WANG, C. “Construction of an Impedimetric Immunosensor for Label-Free Detecting Carbofuran Residual in Agricultural and Environmental Samples.” *Food Control*, 53: 72, 2015.
  80. MUTREJA, R.; JARIYAL, M.; PATHANIA, P.; SHARMA, A.; SAHOO, D. K.; & SURI, C. R. “Novel Surface Antigen Based Impedimetric Immunosensor for Detection of Salmonella Typhimurium in Water and Juice Samples.” *Biosens. Bioelectron.*, 85: 707, 2016.
  81. ERMOLAEVA, T.; FARAFONOVA, O.; & KARASEVA, N. “Possibilities and Prospects of Immunosensors for a Highly Sensitive Pesticide Detection in Vegetables and Fruits: A Review.” *Food Anal. Methods*, 12 (12): 2785, 2019.
  82. MEHMANDOUST, M.; GUMUS, Z. P.; SOYLAK, M.; & ERK, N. “Electrochemical Immunosensor for Rapid and Highly Sensitive Detection of SARS-CoV-2 Antigen in the Nasal Sample.” *Talanta*, 240: 123211, 2022.
  83. DÍAZ-FERNÁNDEZ, A.; BERNALTE, E.; FERNÁNDEZ-RAMOS, C.; MOISE, S.; ESTRELA, P.; & DI LORENZO, M. “An Impedimetric Immunosensor for the Selective Detection of CD34+ T-Cells in Human Serum.” *Sensors Actuators B Chem.*, 356: 131306, 2022.
  84. CALIFF, R. M. “Biomarker Definitions and Their Applications.” *Exp. Biol. Med.*, 243 (3): 213, 2018.
  85. HUSS, R. “Biomarkers.” IN: *Translational Regenerative Medicine*. ATALA, A.; & ALLICKSON, J. (Eds.). Elsevier Inc., 2014. p. 235–241.
  86. SHAMSAZAR, A.; ASADI, A.; SEIFZADEH, D.; & MAHDAVI, M. “A Novel and Highly Sensitive Sandwich-Type Immunosensor for Prostate-

- Specific Antigen Detection Based on MWCNTs-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanocomposite.” *Sensors Actuators B Chem.*, 346: 130459, 2021.
87. HU, Y.; CHEN, R.; CHEN, M.; AN, J.; LUO, M.; LYU, Y.; HU, N.; GUO, W.; LI, W.; & LIU, Y. “Magnetic Separation and Enzymatic Catalysis Conjugated Colorimetric Immunosensor for Hepatitis B Surface Antigen Detection.” *Microchem. J.*, 168: 106155, 2021.
  88. RIEDEL, S. “Predicting Bacterial Versus Viral Infection, or None of the Above: Current and Future Prospects of Biomarkers.” *Clin. Lab. Med.*, 39 (3): 453, 2019.
  89. PARATE, K.; RANGNEKAR, S. V.; JING, D.; MENDIVELSO-PEREZ, D. L.; DING, S.; SECOR, E. B.; SMITH, E. A.; HOSTETTER, J. M.; HERSAM, M. C.; & CLAUSSEN, J. C. “Aerosol-Jet-Printed Graphene Immunosensor for Label-Free Cytokine Monitoring in Serum.” *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 12 (7): 8592, 2020.
  90. LORENZEN, A. L.; DOS SANTOS, A. M.; DOS SANTOS, L. P.; DA SILVA PINTO, L.; CONCEIÇÃO, F. R.; & WOLFART, F. “PEDOT-AuNPs-Based Impedimetric Immunosensor for the Detection of SARS-CoV-2 Antibodies.” *Electrochim. Acta*, 404: 139757, 2022.
  91. LI, J.; BAI, Y.; LI, F.; ZHANG, Y.; XIE, Q.; ZHANG, L.; HUA, L.; XIONG, Q.; SHAN, Y.; BU, Z.; SHAO, G.; FENG, Z.; ZHAO, D.; & LIU, F. “Rapid and Ultra-Sensitive Detection of African Swine Fever Virus Antibody on Site Using QDM Based-ASFV Immunosensor (QAIS).” *Anal. Chim. Acta*, 1189: 339187, 2022.
  92. ISRAEL, A.; SHENHAR, Y.; GREEN, I.; MERZON, E.; GOLAN-COHEN, A.; SCHÄFFER, A. A.; RUPPIN, E.; VINKER, S.; & MAGEN, E. “Large-Scale Study of Antibody Titer Decay Following BNT162b2 mRNA Vaccine or SARS-CoV-2 Infection.” *medRxiv Prepr. Serv. Heal. Sci.*, : 1, 2021.
  93. GUTHRIE, J. W. “General Considerations When Dealing with Biological Fluid Samples.” IN: *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*. Elsevier, 2012. p. 1–19.
  94. AYDIN, S. “A Short History, Principles, and Types of ELISA, and Our Laboratory Experience with Peptide/Protein Analyses Using ELISA.” *Peptides*, 72: 4, 2015.
  95. BIAGINI, R. E.; SMITH, J. P.; SAMMONS, D. L.; MACKENZIE, B. A.; STRILEY, C. A. F.; ROBERTSON, S. K.; & SNAWDER, J. E. “Analytical Performance Criteria the Use of Immunochemical and Biosensor Methods for Occupational and Environmental Monitoring. Part I: Introduction to Immunoassays.” *J. Occup. Environ. Hyg.*, 5 (2): D25, 2007.
  96. ESPINA, V.; WOODHOUSE, E. C.; WULFKUHLE, J.; ASMUSSEN, H. D.; PETRICOIN, E. F.; & LIOTTA, L. A. “Protein Microarray Detection Strategies: Focus on Direct Detection Technologies.” *J. Immunol. Methods*, 290 (1–2): 121, 2004.



97. NELLAIAPPAN, S.; MANDALI, P. K.; PRABAKARAN, A.; & KRISHNAN, U. M. "Electrochemical Immunosensors for Quantification of Procalcitonin: Progress and Prospects." *Chemosensors*, 9 (7): 1, 2021.
98. JANEGITZ, B. C.; CANCINO, J.; & ZUCOLOTTO, V. "Disposable Biosensors for Clinical Diagnosis." : 29, 2014.
99. WARSINKE, A.; BENKERT, A.; & SCHELLER, F. W. "Electrochemical Immunoassays." *Fresenius. J. Anal. Chem.*, 366 (6–7): 622, 2000.
100. RASHIDIAN, M.; DOZIER, J. K.; & DISTEFANO, M. D. "Enzymatic Labeling of Proteins: Techniques and Approaches." *Bioconjug. Chem.*, 24 (8): 1277, 2013.
101. SPENCER, J. S.; & BRENNAN, P. J. "The Role of Mycobacterium Leprae Phenolic Glycolipid I(PGL-I) in Serodiagnosis and in the Pathogenesis of Leprosy." *Lepr. Rev.*, 82: 344, 2011.
102. WANG, H.; LIU, W.; JIN, Y.; YU, M.; JIANG, H.; TAMURA, T.; MAEDA, Y.; & MAKINO, M. "Detection of Antibodies to Both M . Leprae PGL-I and MMP-II to Recognize Leprosy Patients at an Early Stage of Disease Progression." *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, : 10, 2015.
103. LIMA, M. I. S.; CAPPARELLI, F. E.; DIAS OLIVEIRA, J. das D.; FUJIMURA, P. T.; MORAES, E. C. dos S.; ARAUJO, E. C. B.; SILVA, N. M.; ALVES-BALVEDI, R. P.; BRITO-MADURRO, A. G.; GOULART, I. M. B.; & GOULART, L. R. "Biotechnological and Immunological Platforms Based on PGL-I Carbohydrate-Like Peptide of Mycobacterium Leprae for Antibodies Detection Among Leprosy Clinical Forms." *Front. Microbiol.*, 11 (March): 1, 2020.
104. SPENCER, J. S.; DUTHIE, M. S.; GELUK, A.; BALAGON, M. F.; KIM, H. J.; WHEAT, W. H.; CHATTERJEE, D.; JACKSON, M.; LI, W.; KURIHARA, J. N.; MAGHANOY, A.; MALLARI, I.; SAUNDERSON, P.; BRENNAN, P. J.; & DOCKRELL, H. M. "Identification of Serological Biomarkers of Infection, Disease Progression and Treatment Efficacy for Leprosy." *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 107 (SUPPL.1): 79, 2012.
105. HOLEC-GASIOR, L.; FERRA, B.; HISZCZYŃSKA-SAWICKA, E.; & KUR, J. "The Optimal Mixture of Toxoplasma Gondii Recombinant Antigens (GRA1, P22, ROP1) for Diagnosis of Ovine Toxoplasmosis." *Vet. Parasitol.*, 206 (3–4): 146, 2014.
106. VASUDEVAN, D.; S, S.; & VAIDYANATHAN, K. "Proteins: Structure and Function." IN: *Textbook of Biochemistry for Medical Students*. Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd., 2016. p. 36–36.
107. BLANCO, A.; & BLANCO, G. "Proteins." IN: *Medical Biochemistry*. Elsevier, 2017. p. 21–71.
108. PANDEY, S.; MALVIYA, G.; & CHOTTOVA DVORAKOVA, M. "Role of Peptides in Diagnostics." *Int. J. Mol. Sci.*, 22 (16): 8828, 2021.
109. ALBAN, S. M.; DE MOURA, J. F.; THOMAZ-SOCCOL, V.; SÉKULA, S. B.; ALVARENGA, L. M.; MIRA, M. T.; OLORTEGUI, C. C.; & MINOZZO, J. C. "Phage Display and Synthetic Peptides as Promising

- Biotechnological Tools for the Serological Diagnosis of Leprosy.” *PLoS One*, 9 (8): 1, 2014.
110. MACHADO, A.; LIRIA, C. W.; PROTI, P. B.; REMUZGO, C.; & MIRANDA, M. T. M. “Sínteses Química e Enzimática de Peptídeos: Princípios Básicos e Aplicações.” *Quim. Nova*, 27 (5): 781, 2004.
  111. GOMARA, M.; & HARO, I. “Synthetic Peptides for the Immunodiagnosis of Human Diseases.” *Curr. Med. Chem.*, 14 (5): 531, 2007.
  112. SFRAGANO, P. S.; MORO, G.; POLO, F.; & PALCHETTI, I. “The Role of Peptides in the Design of Electrochemical Biosensors for Clinical Diagnostics.” *Biosensors*, 11 (8): 246, 2021.
  113. LIMA, M. I. S.; CAPPARELLI, F. E.; DIAS OLIVEIRA, J. das D.; FUJIMURA, P. T.; MORAES, E. C. dos S.; ARAUJO, E. C. B.; SILVA, N. M.; ALVES-BALVEDI, R. P.; BRITO-MADURRO, A. G.; GOULART, I. M. B.; & GOULART, L. R. “Biotechnological and Immunological Platforms Based on PGL-I Carbohydrate-Like Peptide of Mycobacterium Leprae for Antibodies Detection Among Leprosy Clinical Forms.” *Front. Microbiol.*, 112020.
  114. YOTSUMOTO NETO, S.; SOUSA LIMA, M. I.; FERREIRA PEREIRA, S. R.; GOULART, L. R.; DE CÁSSIA SILVA LUZ, R.; & DAMOS, F. S. “Immunodiagnostic of Leprosy Exploiting a Photoelectrochemical Platform Based on a Recombinant Peptide Mimetic of a Mycobacterium Leprae Antigen.” *Biosens. Bioelectron.*, 143 (June): 111625, 2019.
  115. CORDEIRO, T. A. R.; DE RESENDE, M. A. C.; MORAES, S. C. dos S.; FRANCO, D. L.; PEREIRA, A. C.; & FERREIRA, L. F. “Electrochemical Biosensors for Neglected Tropical Diseases: A Review.” *Talanta*, 234: 122617, 2021.
  116. DE J. CERQUEIRA, E.; B. SANTANA, I.; S. DA SILVA, K.; & C. DOS S. JUNIOR, M. “Identification of Potential Inhibitors of the Antigen 85C of Mycobacterium Tuberculosis from Natural Resources by Virtual Screening.” *Rev. Virtual Química*, 11 (2): 449, 2019.
  117. RUNNING, D. R.; KLABUNDE, T.; BESRA, G. S.; VISSA, V. D.; BELISLE, J. I.; & SACCHETTINI, J. C. “Crystal Structure of the Secreted Form of Antigen 85C Reveals Potential Targets for Mycobacterial Drugs and Vaccines.” *Nat. Struct. Biol.*, 7 (2): 141, 2000.
  118. WILLIAMS, D. L.; TORRERO, M.; WHEELER, P. R.; TRUMAN, R. W.; YODER, M.; MORRISON, N.; BISHAI, W. R.; & GILLIS, T. P. “Biological Implications of Mycobacterium Leprae Gene Expression during Infection.” *Microb. Physiol.*, 8 (1): 58, 2004.
  119. SOARES, B. A.; TEIXEIRA, K. N.; DE SANTANA, J. F.; DE ASSIS, B. L. M.; ZOCATELLI-RIBEIRO, C.; SCANDELARI, J. P. S.; THOMAZ-SOCCOL, V.; MACHADO-DE-ÁVILA, R. A.; ALVARENGA, L. M.; & DE MOURA, J. “Epitope Mapping from Mycobacterium Leprae Proteins: Convergent Data from in Silico and in Vitro Approaches for Serodiagnosis of Leprosy.” *Mol. Immunol.*, 138: 48, 2021.

120. SPENCER, J. S.; KIM, H. J.; WHEAT, W. H.; CHATTERJEE, D.; BALAGON, M. V.; CELLONA, R. V.; TAN, E. V.; GELBER, R.; SAUNDERSON, P.; DUTHIE, M. S.; REECE, S. T.; BURMAN, W.; BELKNAP, R.; MAC KENZIE, W. R.; GELUK, A.; OSKAM, L.; DOCKRELL, H. M.; & BRENNAN, P. J. "Analysis of Antibody Responses to Mycobacterium Leprae Phenolic Glycolipid I, Lipoarabinomannan, and Recombinant Proteins To Define Disease Subtype-Specific Antigenic Profiles in Leprosy." *Clin. Vaccine Immunol.*, 18 (2): 260, 2011.
121. ALBAN, S. M.; DE MOURA, J. F.; MINOZZO, J. C.; MIRA, M. T.; & SOCCOL, V. T. "Identification of Mimotopes of Mycobacterium Leprae as Potential Diagnostic Reagents." *BMC Infect. Dis.*, 13 (1)2013.
122. DE SANTANA, J. F.; MARIÂNGELA, R. B.; PICHETH, G. F.; YAMANAKA, I. B.; FOGAÇA, R. L.; THOMAZ-SOCCOL, V.; MACHADO-DE-AVILA, R. A.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C.; & RITA, M. "Engineered Biomarkers for Leprosy Diagnosis Using Labeled and Label-Free Analysis." *Talanta*, 187 (May): 165, 2018.
123. DUTHIE, M. S.; HAY, M. N.; RADA, E. M.; CONVIT, J.; ITO, L.; OYAFUSO, L. K. M.; MANINI, M. I. P.; GOULART, I. M. B.; LOBATO, J.; GOULART, L. R.; CARTER, D.; & REED, S. G. "Specific IgG Antibody Responses May Be Used to Monitor Leprosy Treatment Efficacy and as Recurrence Prognostic Markers." *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 30 (10): 1257, 2011.
124. REECE, S. T.; IRETON, G.; MOHAMATH, R.; GUDERIAN, J.; GOTO, W.; GELBER, R.; GROATHOUSE, N.; SPENCER, J.; BRENNAN, P.; & REED, S. G. "ML0405 and ML2331 Are Antigens of Mycobacterium Leprae with Potential for Diagnosis of Leprosy." *Clin. Vaccine Immunol.*, 13 (3): 333, 2006.
125. DUTHIE, M. S.; GOTO, W.; IRETON, G. C.; REECE, S. T.; CARDOSO, L. P. V.; MARTELLI, C. M. T.; STEFANI, M. M. A.; NAKATANI, M.; DE JESUS, R. C.; NETTO, E. M.; BALAGON, M. V. F.; TAN, E.; GELBER, R. H.; MAEDA, Y.; MAKINO, M.; HOFT, D.; & REED, S. G. "Use of Protein Antigens for Early Serological Diagnosis of Leprosy." *Clin. Vaccine Immunol.*, 14 (11): 1400, 2007.
126. DO, J.; & AHN, C. H. "A Polymer Lab-on-a-Chip for Magnetic Immunoassay with on-Chip Sampling and Detection Capabilities." *Lab Chip*, 8 (4): 542, 2008.
127. LI, K.; XU, J.; LI, P.; & FAN, Y. "A Review of Magnetic Ordered Materials in Biomedical Field: Constructions, Applications and Prospects." *Compos. Part B Eng.*, 228: 109401, 2022.
128. HA, Y.; & KIM, I. "Recent Developments in Innovative Magnetic Nanoparticles-Based Immunoassays: From Improvement of Conventional Immunoassays to Diagnosis of COVID-19." *Biochip J.*, No. i2022.
129. PASTUCHA, M.; FARKA, Z.; LACINA, K.; MIKUŠOVÁ, Z.; &

- SKLÁDAL, P. "Magnetic Nanoparticles for Smart Electrochemical Immunoassays: A Review on Recent Developments." *Microchim. Acta*, 186 (5)2019.
130. DIXIT, C. K.; KADIMISETTY, K.; OTIENO, B. A.; TANG, C.; MALLA, S.; KRAUSE, C. E.; & RUSLING, J. F. "Electrochemistry-Based Approaches to Low Cost, High Sensitivity, Automated, Multiplexed Protein Immunoassays for Cancer Diagnostics." *Analyst*, 141 (2): 536, 2016.
131. HSING, I. M.; XU, Y.; & ZHAO, W. "Micro- and Nano-Magnetic Particles for Applications in Biosensing." *Electroanalysis*, 19 (7–8): 755, 2007.
132. NASCIMENTO, E. D.; FONSECA, W. T.; DE OLIVEIRA, T. R.; DE CORREIA, C. R. S. T. B.; FAÇA, V. M.; DE MORAIS, B. P.; SILVESTRINI, V. C.; POTT-JUNIOR, H.; TEIXEIRA, F. R.; & FARIA, R. C. "COVID-19 Diagnosis by SARS-CoV-2 Spike Protein Detection in Saliva Using an Ultrasensitive Magneto-Assay Based on Disposable Electrochemical Sensor." *Sensors Actuators B Chem.*, 353: 131128, 2022.
133. LEÓN-JANAMPA, N.; SHINKARUK, S.; GILMAN, R. H.; KIRWAN, D. E.; FOUQUET, E.; SZLOSEK, M.; SHEEN, P.; & ZIMIC, M. "Biorecognition and Detection of Antigens from Mycobacterium Tuberculosis Using a Sandwich ELISA Associated with Magnetic Nanoparticles." *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 215: 114749, 2022.
134. CLARK JR., L. C.; & LYONS, C. "ELECTRODE SYSTEMS FOR CONTINUOUS MONITORING IN CARDIOVASCULAR SURGERY." *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 102 (1): 29, 1962.
135. JANG, C.; LEE, H.-J.; & YOON, J.-G. "Radio-Frequency Biosensors for Real-Time and Continuous Glucose Detection." *Sensors*, 21 (5): 1843, 2021.
136. AYDIN, M.; AYDIN, E. B.; & SEZGINTÜRK, M. K. "Advances in Immunosensor Technology." *Adv. Clin. Chem.*, 102: 1, 2021.
137. WANG, J. "Electrochemical Biosensors: Towards Point-of-Care Cancer Diagnostics." *Biosens. Bioelectron.*, 21 (10): 1887, 2006.
138. CHO, I. H.; LEE, J.; KIM, J.; KANG, M. S.; PAIK, J. K.; KU, S.; CHO, H. M.; IRUDAYARAJ, J.; & KIM, D. H. "Current Technologies of Electrochemical Immunosensors: Perspective on Signal Amplification." *Sensors (Switzerland)*, 18 (1): 1, 2018.
139. YAN, Q.; ZHI, N.; YANG, L.; XU, G.; FENG, Q.; ZHANG, Q.; & SUN, S. "A Highly Sensitive Uric Acid Electrochemical Biosensor Based on a Nano-Cube Cuprous Oxide/Ferrocene/Uricase Modified Glassy Carbon Electrode." *Sci. Rep.*, 10 (1): 10607, 2020.
140. YE, Y.; JI, J.; PI, F.; YANG, H.; LIU, J.; ZHANG, Y.; XIA, S.; WANG, J.; XU, D.; & SUN, X. "A Novel Electrochemical Biosensor for Antioxidant Evaluation of Phloretin Based on Cell-Alginate/L-Cysteine/Gold Nanoparticle-Modified Glassy Carbon Electrode." *Biosens.*

- Bioelectron., 119: 119, 2018.
141. LI, N.; HUANG, X.; SUN, D.; YU, W.; TAN, W.; LUO, Z.; & CHEN, Z. "Dual-Aptamer-Based Voltammetric Biosensor for the Mycobacterium Tuberculosis Antigen MPT64 by Using a Gold Electrode Modified with a Peroxidase Loaded Composite Consisting of Gold Nanoparticles and a Zr(IV)/Terephthalate Metal-Organic Framework." *Microchim. Acta*, 185 (12): 543, 2018.
  142. KAFI, A. K. M.; ALIM, S.; JOSE, R.; & YUSOFF, M. M. "Fabrication of a Glucose Oxidase/Multiporous Tin-Oxide Nanofiber Film on Prussian Blue-Modified Gold Electrode for Biosensing." *J. Electroanal. Chem.*, 852: 113550, 2019.
  143. KRAUSE, C. E.; OTIENO, B. A.; LATUS, A.; FARIA, R. C.; PATEL, V.; GUTKIND, J. S.; & RUSLING, J. F. "Rapid Microfluidic Immunoassays of Cancer Biomarker Proteins Using Disposable Inkjet-Printed Gold Nanoparticle Arrays." *Chem. Open*, 2 (4): 141, 2013.
  144. POL, R.; CÉSPEDES, F.; GABRIEL, D.; & BAEZA, M. "Fully Integrated Screen-Printed Sulfide-Selective Sensor on a 3D-Printed Potentiometric Microfluidic Platform." *Sensors Actuators, B Chem.*, 290 (March): 364, 2019.
  145. TALEAT, Z.; KHOSHROO, A.; & MAZLOUM-ARDAKANI, M. "Screen-Printed Electrodes for Biosensing: A Review (2008-2013)." *Microchim. Acta*, 181 (9–10): 865, 2014.
  146. FUAD, N. M.; CARVE, M.; KASLIN, J.; & WLODKOWIC, D. "Characterization of 3D-Printed Moulds for Soft Lithography of Millifluidic Devices." *Micromachines*, 9 (3): 1, 2018.
  147. SHER, M.; FAHEEM, A.; ASGHAR, W.; & CINTI, S. "Nano-Engineered Screen-Printed Electrodes: A Dynamic Tool for Detection of Viruses." *TrAC Trends Anal. Chem.*, 143: 116374, 2021.
  148. KERR, E.; ALEXANDER, R.; FRANCIS, P. S.; GUIJT, R. M.; BARBANTE, G. J.; & DOEVEN, E. H. "A Comparison of Commercially Available Screen-Printed Electrodes for Electrogenerated Chemiluminescence Applications." *Front. Chem.*, 82021.
  149. HANNAH, S.; ADDINGTON, E.; ALCORN, D.; SHU, W.; HOSKISSON, P. A.; & CORRIGAN, D. K. "Rapid Antibiotic Susceptibility Testing Using Low-Cost, Commercially Available Screen-Printed Electrodes." *Biosens. Bioelectron.*, 145: 111696, 2019.
  150. AFONSO, A. S.; ULIANA, C. V.; MARTUCCI, D. H.; & FARIA, R. C. "Simple and Rapid Fabrication of Disposable Carbon-Based Electrochemical Cells Using an Electronic Craft Cutter for Sensor and Biosensor Applications." *Talanta*, 146: 381, 2016.
  151. SCHEUTZ, G. M.; LESSARD, J. J.; SIMS, M. B.; & SUMERLIN, B. S. "Adaptable Crosslinks in Polymeric Materials: Resolving the Intersection of Thermoplastics and Thermosets." *J. Am. Chem. Soc.*, 141 (41): 16181, 2019.

152. HOURSTON, D. J. "Degradation of Plastics and Polymers." IN: Reference Module in Materials Science and Materials Engineering. Elsevier, 2016. p. 1–19.
153. YAFIA, M.; SHUKLA, S.; & NAJJARAN, H. "Fabrication of Digital Microfluidic Devices on Flexible Paper-Based and Rigid Substrates via Screen Printing." *J. Micromechanics Microengineering*, 25 (5): 057001, 2015.
154. DE OLIVEIRA, R. A. G.; CAMARGO, F.; PESQUERO, N. C.; & FARIA, R. C. "A Simple Method to Produce 2D and 3D Microfluidic Paper-Based Analytical Devices for Clinical Analysis." *Anal. Chim. Acta*, 957: 40, 2017.
155. FREITAS, T. A.; PROENÇA, C. A.; BALDO, T. A.; MATERÓN, E. M.; WONG, A.; MAGNANI, R. F.; & FARIA, R. C. "Ultrasensitive Immunoassay for Detection of Citrus Tristeza Virus in Citrus Sample Using Disposable Microfluidic Electrochemical Device." *Talanta*, 205 (June): 120110, 2019.
156. CINCOTTO, F. H.; FAVA, E. L.; MORAES, F. C.; FATIBELLO-FILHO, O.; & FARIA, R. C. "A New Disposable Microfluidic Electrochemical Paper-Based Device for the Simultaneous Determination of Clinical Biomarkers." *Talanta*, 195: 62, 2019.
157. FONSECA, W. T.; CINCOTTO, F. H.; LOURENCAO, B. C.; DE ALMEIDA, S. V.; MORAES, F. C.; FATIBELLO-FILHO, O.; DE CARVALHO, A. C.; CARVALHO, A. L.; MELENDEZ, M. E.; & FARIA, R. C. "Ultrasensitive Magnetogenoassay for Detection of MicroRNA for Diagnosis of Metastatic Lymph Nodes in Head and Neck Cancer Using Disposable Electrodes." *Sensors Actuators B Chem.*, 352: 131040, 2022.
158. MARTÍNEZ-PERIÑÁN, E.; GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, C.; GARCÍA-MENDIOLA, T.; & LORENZO, E. "Electrochemiluminescence Biosensors Using Screen-Printed Electrodes." *Biosensors*, 10 (9): 118, 2020.
159. BEITOLLAHI, H.; MOHAMMADI, S. Z.; SAFAEI, M.; & TAJIK, S. "Applications of Electrochemical Sensors and Biosensors Based on Modified Screen-Printed Electrodes: A Review." *Anal. Methods*, 12 (12): 1547, 2020.
160. DE OLIVEIRA, R. A. G.; MATERON, E. M.; MELENDEZ, M. E.; CARVALHO, A. L.; & FARIA, R. C. "Disposable Microfluidic Immunoarray Device for Sensitive Breast Cancer Biomarker Detection." *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 9 (33): 27433, 2017.
161. PROENÇA, C. A.; BALDO, T. A.; FREITAS, T. A.; MATERÓN, E. M.; WONG, A.; DURÁN, A. A.; MELENDEZ, M. E.; ZAMBRANO, G.; & FARIA, R. C. "Novel Enzyme-Free Immunomagnetic Microfluidic Device Based on  $\text{Co}_{0.25}\text{Zn}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4$  for Cancer Biomarker Detection." *Anal. Chim. Acta*, 1071: 59, 2019.

162. DE OLIVEIRA, T. R.; ERBERELI, C. R.; MANZINE, P. R.; MAGALHÃES, T. N. C.; BALTHAZAR, M. L. F.; COMINETTI, M. R.; & FARIA, R. C. “Early Diagnosis of Alzheimer’s Disease in Blood Using a Disposable Electrochemical Microfluidic Platform.” *ACS Sensors*, 5 (4): 1010, 2020.
163. STROOCK, A. D. “Microfluidics.” IN: *Optical Biosensors: Today and Tomorrow*. 2008. p. 659–682.
164. WHITESIDES, G. M. “The Origins and the Future of Microfluidics.” *Nature*, 442 (7101): 368, 2006.
165. WHITESIDES, G. M. “The Origins and the Future of Microfluidics.” *Nature*, 442 (7101): 368, 2006.
166. KUDR, J.; ZITKA, O.; KLIMANEK, M.; VRBA, R.; & ADAM, V. “Microfluidic Electrochemical Devices for Pollution Analysis—A Review.” *Sensors Actuators, B Chem.*, 246: 578, 2017.
167. PUIU, M.; & BALA, C. “Microfluidics-Integrated Biosensing Platforms as Emergency Tools for on-Site Field Detection of Foodborne Pathogens.” *TrAC - Trends Anal. Chem.*, 125: 115831, 2020.
168. ORTEGA, F. G.; GÓMEZ, G. E.; GONZÁLEZ-MARTINEZ, C.; VALERO, T.; EXPÓSITO-HERNÁNDEZ, J.; PUCHE, I.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, A.; SERRANO, M. J.; LORENTE, J. A.; & FERNÁNDEZ-BALDO, M. A. “A Novel, Quick, and Reliable Smartphone-Based Method for Serum PSA Quantification: Original Design of a Portable Microfluidic Immunosensor-Based System.” *Cancers (Basel)*, 14 (18): 4483, 2022.
169. NILVEBRANT, J.; & ROCKBERG, J. “An Introduction to Epitope Mapping” 2018. p. 1–10.
170. PLACKETT, R. L.; & BURMAN, J. P. “The Design of Optimum Multifactorial Experiments.” *Biometrika*, 33 (4): 305, 1946.
171. BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; & BRUNS, R. E. *Como Fazer Experimentos: Pesquisa e Desenvolvimento Na Ciência e Na Indústria*. 2001.
172. PANDEY, P. C.; UPADHYAY, S.; PATHAK, H. C.; & PANDEY, C. M. D. “Studies on Ferrocene Immobilized Sol-Gel Glasses and Its Application in the Construction of a Novel Solid-State Ion Sensor.” *Electroanalysis*, 11 (13): 950, 1999.
173. PANDEY, P.; & UPADHYAY, B. “Role of Palladium in the Redox Electrochemistry of Ferrocene Monocarboxylic Acid Encapsulated Within ORMOSIL Networks.” *Molecules*, 10 (6): 728, 2005.
174. PEREIRA, F. M. V.; & PEREIRA-FILHO, E. R. “Aplicação de Programa Computacional Livre Em Planejamento de Experimentos: Um Tutorial.” *Quim. Nova*, 41 (9): 1061, 2018.
175. EURACHEM. “Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics.” *Eurachem*, 2014., 1–70.
176. NATA. “General Accreditation Guidance — Validation and Verification

- of Quantitative and Qualitative Test Methods.” *National Association of Testing Authorities*, 2018., 1–31.
177. INMETRO. “Guidance in Validation of Analytical Methods.” *Inst. Nac. Metrol. Qual. e Tecnol.*, : 31, 2016.
  178. ULIANA, C. V.; PEVERARI, C. R.; AFONSO, A. S.; COMINETTI, M. R.; & FARIA, R. C. “Fully Disposable Microfluidic Electrochemical Device for Detection of Estrogen Receptor Alpha Breast Cancer Biomarker.” *Biosens. Bioelectron.*, 99: 156, 2018.
  179. RUAN, C.; & LI, Y. “Detection of Zeptomolar Concentrations of Alkaline Phosphatase Based on a Tyrosinase and Horse-Radish Peroxidase Bienzyme Biosensor.” *Talanta*, 54 (6): 1095, 2001.
  180. CASTRO, K. R.; SETTI, G. O.; DE OLIVEIRA, T. R.; RODRIGUES-JESUS, M. J.; BOTOSSO, V. F.; PERINI DE ARAUJO, A. P.; DURIGON, E. L.; FERREIRA, L. C. S.; & FARIA, R. C. “Electrochemical Magneto-Immunoassay for Detection of Zika Virus Antibody in Human Serum.” *Talanta*, 256: 124277, 2023.
  181. THERMO FISHER. Dynabeads® MyOne™ Carboxylic Acid <https://www.thermofisher.com/br/en/home/references/protocols/proteins-expression-isolation-and-analysis/protein-isolation-protocol/dynabeads-myone-carboxylic-acid.html#prot2> (accessed May 17, 2020).
  182. HUDARI, F. F.; DA SILVA, B. F.; PIVIDORI, M. I.; & ZANONI, M. V. B. “Voltammetric Sensor Based on Magnetic Particles Modified Composite Electrode for Determination of Triamterene in Biological Sample.” *J. Solid State Electrochem.*, 20 (9): 2491, 2016.
  183. NEWTON, P.; HARRISON, P.; & CLULOW, S. “A Novel Method for Determination of the Affinity of Protein: Protein Interactions in Homogeneous Assays.” *J. Biomol. Screen.*, 13 (7): 674, 2008.
  184. BRAGA, A. C. da S. “Curvas ROC: Aspectos Funcionais e Aplicações,” Universidade do Minho, 2000.
  185. SCHMID, F.; & BEER, L. “Biological Macromolecules : Spectrophotometry Concentrations.” *Methods*, : 1, 2001.
  186. PEREIRA, F. M. V.; & PEREIRA-FILHO, E. R. “Aplicação de Programa Computacional Livre Em Planejamento de Experimentos: Um Tutorial.” *Quim. Nova*, 41 (9): 1061, 2018.
  187. VASHIST, S. K.; & LUONG, J. H. T. *Bioanalytical Requirements and Regulatory Guidelines for Immunoassays*. Elsevier Inc., 2018.
  188. SHAH, V. P.; MIDHA, K. K.; FINDLAY, J. W. A.; HILL, H. M.; HULSE, J. D.; MCGILVERAY, I. J.; MCKAY, G.; MILLER, K. J.; PATNAIK, R. N.; POWELL, M. L.; TONELLI, A.; VISWANATHAN, C. T.; & YACOBI, A. “Bioanalytical Method Validation - A Revisit with a Decade of Progress.” *Pharm. Res.*, 17 (12): 1551, 2000.
  189. VERBAKEL, J. Y.; STEYERBERG, E. W.; UNO, H.; DE COCK, B.; WYNANTS, L.; COLLINS, G. S.; & VAN CALSTER, B. “ROC Plots Showed No Added Value above the AUC When Evaluating the



- Performance of Clinical Prediction Models.” *J. Clin. Epidemiol.*, 126: 207, 2020.
190. MANDREKAR, J. N. “Receiver Operating Characteristic Curve in Diagnostic Test Assessment.” *J. Thorac. Oncol.*, 5 (9): 1315, 2010.
  191. KANNO, Y.; ZHOU, Y.; FUKUMA, T.; & TAKAHASHI, Y. “Alkaline Phosphatase-based Electrochemical Analysis for Point-of-Care Testing.” *Electroanalysis*, 34 (2): 161, 2022.
  192. NSABIMANA, A.; LAN, Y.; DU, F.; WANG, C.; ZHANG, W.; & XU, G. “Alkaline Phosphatase-Based Electrochemical Sensors for Health Applications.” *Anal. Methods*, 11 (15): 1996, 2019.
  193. EL-MOGHAZY, A. Y.; HUO, J.; AMALY, N.; VASYLIEVA, N.; HAMMOCK, B. D.; & SUN, G. “An Innovative Nanobody-Based Electrochemical Immunosensor Using Decorated Nylon Nanofibers for Point-of-Care Monitoring of Human Exposure to Pyrethroid Insecticides.” *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 12 (5): 6159, 2020.
  194. MASSON, M. “4-Amino-1-Naphthylphosphate as a Substrate for the Amperometric Detection of Alkaline Phosphatase Activity and Its Application for Immunoassay.” *Talanta*, 64 (1): 174, 2004.
  195. LEI, J.; KANG, J.; LIU, J.; & WANG, G. “A Novel Electrochemical Sensing Strategy Based on Poly (3, 4-Ethylenedioxythiophene): Polystyrene Sulfonate, AuNPs, and Ag<sup>+</sup> for Highly Sensitive Detection of Alkaline Phosphatase.” *Nanomaterials*, 12 (19): 3392, 2022.
  196. ROCHA, F. R. P.; & NÓBREGA, J. A. “Efeito Schlieren Em Sistemas de Análise Por Injeção Em Fluxo.” *Quim. Nova*, 19 (6): 636, 1996.