

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

**DESENVOLVIMENTO DE DISPOSITIVO ELETROQUÍMICO E SUA
APLICAÇÃO NA DETECÇÃO DE ANTICORPOS VOLTADOS PARA O
DIAGNÓSTICO DE HANSENÍASE**

Izabelly Karol Poncio de Oliveira*

Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para a obtenção do
título de MESTRE EM QUÍMICA,
área de concentração: QUÍMICA
ANALÍTICA

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria

***bolsista FAPESP**

São Carlos – SP

2024



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Izabelly Karol Poncio de Oliveira, realizada em 29/05/2024.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria (UFSCar)

Prof. Dr. Elton Fabiano Sitta (UFSCar)

Prof. Dr. Rafael Martos Buoro (IQSC/USP)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Química.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe Bernadette por ser a melhor mãe que eu poderia ter, por estar sempre comigo mesmo com a distância física entre nós. Por me apoiar e me dar forças e segurança nos momentos que mais precisei, e sempre acreditar em mim e no que sou capaz.

À minha família, meu pai e irmã que estiveram presentes nessa fase da minha vida, me acolhendo e me dando suporte.

À minha psicóloga Mariana, por ser uma profissional incrível que desde o início tem me ensinado a viver de forma equilibrada e a respeitar meus limites, de forma que pude concluir esse mestrado com uma saúde melhor do que quando iniciei.

Ao meu namorado Gabriel, que foi fundamental para me ajudar a tomar as decisões que tomei para vir para São Carlos. Que sempre me incentivou a buscar o melhor para mim.

Aos meus amigos, pessoas incríveis que tive o privilégio de conhecer. Que me ajudaram a enfrentar esses dois anos de mestrado em um estado diferente. Que me ensinaram muito e ainda me ensinam, sendo acolhedores e ótimas companhias para rir e chorar.

Aos amigos do Laboratório de Bioanalítica e Eletroanalítica (LABiE), que além do crescimento como cientista, contribuíram para meu desenvolvimento pessoal. Agradeço em especial à Sthéfane, Evair e Pablo pelas contribuições para o desenvolvimento do trabalho de mestrado. À Sthéfane novamente, por além de me ajudar cientificamente, ser uma das pessoas mais incríveis que esse mestrado pôde me dar o prazer de conhecer.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria, por ter todo o cuidado e paciência de me ensinar sobre o mundo dos biossensores e ser uma inspiração para querer seguir nessa área.

A todos que contribuíram com a minha trajetória, desejo que tudo de bom que vocês me deram volte em dobro.

Aos membros da banca pela disponibilidade e contribuições para o trabalho.

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

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

Aos laboratórios Laboratório de Caracterização Estrutural (LCE) e Laboratório de Analítica, Bioanalítica, Biossensores, Eletroanalítica e Sensores (LABBES) pelas caracterizações necessárias realizadas.

A todos os órgãos de fomento, em especial às agências de fomento Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, nº processo 88887.694070/2022-00) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, nº processo 2022/13605-7) pelas bolsas e recursos concedidos.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ab₂	Rabbit anti-human IgG
Abs	Absorbância
Ag	Prata
AgCl	Cloreto de prata
AgNO₃	Nitrato de prata
AgNP	Nanopartícula de prata
Au	Ouro
AUC	Área sobre a curva
BH₄⁻	Íon borohidreto
C_{Pep}	Concentração do peptídeo sintético
C_{PM}	Concentração das partículas magnéticas
DPR	Desvio Padrão Relativo
E	Potencial
EDC	N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
EDS	Espectroscopia por Dispersão de Elétrons
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
GSH	Glutationa
HCl	Ácido clorídrico
HNO₃	Ácido nítrico
I_p	Corrente de pico
Ig	Imunoglobulina
KCl	Cloreto de potássio
KH₂PO₄	Fosfato de potássio monobásico
LABIE	Laboratório de bioanalítica e eletroanalítica
LFA	Ensaio de fluxo lateral
MB	Multibacilares
MES	Ácido 2-N-morfolinoetanossulfônico
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão

Na₂HPO₄	Fosfato de sódio dibásico
NaBH₄	Borohidreto de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NHS	N-Hidroxisuccinimida
NP	Nanopartícula
NP	Nanopartícula
OMS	Organização Mundial da Saúde
PB	Paubibacilares
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação de cadeia em polimerase em tempo real
PCT	procalcitonina
Pep	Peptídeo sintético
PM	Partícula magnética
PQT-U	Poliquimioterapia Única
Pt	Platina
ROC	Receiver Operating Characteristic
SPE	Eletrodos impressos
SPE	Screen-printed electrode
SUS	Sistema Único de Saúde
TF	Tampão fosfato
Tw	Tween® 20
UV-Vis	Espectroscopia no ultravioleta visível
ΔF	Relação amostra-branco
λ	Comprimento de onda
DPV	Voltametria de Pulso Diferencial (do inglês, <i>Differential Pulse Voltametry</i>)

LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1 - Reagentes utilizados no preparo das AgNPs.	19
TABELA 3.2 - Reagentes necessários para a conjugação do anticorpo secundário na AgNP.	19
TABELA 3.3 - Lista de materiais utilizados na modificação das partículas magnéticas com o peptídeo sintético e para o preparo do branco.....	20
TABELA 3.4 - Relação de equipamentos utilizados no desenvolvimento do trabalho.	21
TABELA 3.5 – Parâmetros experimentais do imunoenensaio proposto referentes utilizados no planejamento e os respectivos níveis codificados.	30
TABELA 3.6 – Resultados experimentais do planejamento para as variáveis 1 (CPM), 2 (C _{pep}), 3 (tempo de captura) e 4 (Tempo de incubação).	30
TABELA 4.1 – Resultados experimentais do planejamento para as variáveis 1 (CPM), 2 (C _{pep}), 3 (tempo de captura) e 4 (Tempo de incubação); e as respostas normalizadas entre o branco a amostra (ΔF (%)).	46
TABELA 4.2 - Valores dos efeitos significativos e os respectivos coeficientes.	49
TABELA 4.3 - Valores de média, desvio-padrão e desvio-padrão relativo referentes aos valores normalizados de corrente para as medidas realizada em um mesmo dia em uma mesma amostra.	52
TABELA 4.4 - Valores de média, desvio-padrão e desvio-padrão relativo referentes aos valores normalizados de corrente para as medidas em dias diferentes utilizando uma mesma amostra.	52

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 - Estrutura de um anticorpo, sendo as cadeias leves representadas em vermelho e em amarelo as cadeias pesadas, ligadas por pontes de dissulfeto (-S-S-).	8
Figura 1.2 - Eletrodos serigrafados em diferentes formatos.	16
FIGURA 3.1 - Fabricação dos dispositivos contendo o arranjo com os 8 eletrodos de trabalho, referência e auxiliar.	23
FIGURA 3.2 - Etapas para a conjugação entre AgNP e o anti-IgG humano.	25
FIGURA 3.3 – Etapas envolvidas na imobilização covalente do peptídeo sintético nas partículas magnéticas.	26
FIGURA 3.4 – Etapas de captura e separação magnética do anti- <i>M. leprae</i> da amostra de soro e da adição do anti-IgG-AgNP para formação do bioconjugado que irá permitir a detecção eletroquímica do alvo.	28
FIGURA 3.5 - Representação das etapas para a formação do bioconjugado, onde em 1º: ligação entre PM modificada com peptídeo sintético e o anticorpo anti- <i>M. leprae</i> ; 2º: ligação entre o bioconjugado anti- <i>M. leprae</i> /PM e o Ab/AgNP; 3º complexo final.	28
FIGURA 3.6 - Esquematização do sistema utilizado para a detecção do anti- <i>M. leprae</i> no sanduíche utilizando SPEs e ímãs.	29
FIGURA 4.1 – Representação esquemáticas da formação das AgNPs e dos íons borohidreto adsorvidos na superfície das AgNPs.	33
FIGURA 4.2 - Espectro de absorção da dispersão das AgNPs sintetizadas.	34
FIGURA 4.3 - Dispersão de AgNPs obtidas via síntese com NaBH ₄ e a sua coloração característica.	35
FIGURA 4.4 - Caracterização por MET das AgNPs sintetizadas. A) Imagem das partículas; B) Histograma com os valores de diâmetros calculados.	36
FIGURA 4.5 – Caracterização das AgNPs por EDS.	36
FIGURA 4.6 - Espectro UV-vis das dispersões de AgNPs e Ab ₂ -AgNP.	37

FIGURA 4.7 - Voltamograma obtido por DPV para eletrodo modificado com AgNP em TF 0,1 mol/L e pH 7,4.....	39
FIGURA 4.8 – Avaliação da diluição da amostra de soro de paciente positivo hanseníase MB e do branco utilizando o imunoenensaio proposto.	40
FIGURA 4.9 - Avaliação da resposta eletroquímica das AgNPs utilizando diferentes eletrólitos de suporte com concentração de 0,1 mol/L. A) Voltamogramas obtidos com os diferentes eletrólitos de suporte; B) Média das correntes de pico obtidas com cada eletrólito de suporte. n=4	41
FIGURA 4.10 - Avaliação do volume de conjugado Ab2-AgNP utilizado no imunoenensaio. A) DPV para o volume de 20 μ L de Ab2-AgNP do branco e amostra positiva; B) Média dos valores de corrente anódica obtidas para os diferentes volumes de AgNP utilizados e diferentes amostras. n=4.....	42
FIGURA 4.11 - Representação do uso da base de imãs. A) Base de imãs acoplada no contato do potenciostato; B) Dispositivo eletroquímico encaixado no contato em cima dos imãs.	44
FIGURA 4.12 - Avaliação da resposta do ensaio imuno-magnético aplicados em amostra do branco e do soro de paciente positivo MB utilizando os imãs fixados manualmente sobre os eletrodos de trabalho e com o suo do suporte com os imãs fixados.	44
FIGURA 4.13 - Avaliação da aplicação do método por diferentes analistas. Voltamogramas obtidos para o branco e amostra de soro de paciente positivo MB com A) para o operador 1 e B) operador 2. C) Gráfico de barras com as respostas de correntes obtidas por cada analista. n=4.....	45
FIGURA 4.14 - Significância dos efeitos referentes as variáveis 1 (C_{PM}), 2 (C_{Pep}), 3 (Tempo de captura) e 4 (Tempo de incubação).	48
FIGURA 4.15 - Significância dos efeitos considerados significativo pelo modelo anterior referentes as variáveis 1 (C_{PM}), 2 (C_{Pep}), 3 (Tempo de captura) e 4 (Tempo de incubação).	49

FIGURA 4.16 - Gráficos de contorno referentes ao planejamento fatorial 2 ³ relacionando as variáveis 1 e 2 (A), 1 e 4 (B) e 2 e 4 (C).....	51
FIGURA 4.17 - Curva ROC obtida aplicando o método proposto em amostra de indivíduos saudáveis e pacientes diagnosticados com Hanseníase MB.....	54
FIGURA 4.18 - Diagrama de pontos referentes aos resultados obtidos com imunoensaio proposto aplicado nas coortes de indivíduos saudáveis e pacientes Hanseníase classificados como MB.	55

RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE DISPOSITIVO ELETROQUÍMICO E SUA APLICAÇÃO NA DETECÇÃO DE ANTICORPOS VOLTADOS PARA O DIAGNÓSTICO DE HANSENÍASE. A hanseníase é uma doença tropical negligenciada, causada pela bactéria *Mycobacterim leprae* que afeta principalmente os nervos periféricos, sendo o seu diagnóstico realizado em sua maioria por meio de exame clínico. Neste trabalho, foi desenvolvido um magneto-imunoensaio para a detecção de anticorpos anti-*M. leprae* em soro utilizando nanopartículas de prata como marcador eletroquímico, visando sua aplicação para o diagnóstico da hanseníase. Para isto foram confeccionados dispositivos eletroquímicos serigrafados com tinta de carbono e colados imãs na base de cada eletrodo de trabalho. As nanopartículas de prata (AgNPs) foram sintetizadas e caracterizadas tanto por Espectroscopia do UV visível (UV-vis) quanto por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). Foram utilizadas partículas magnéticas (PM) modificadas com peptídeos sintéticos obtidos da proteína 85B da *M. leprae*. Além disso, foram marcadas as AgNPs com um anticorpo secundário anti-IgG humano, de forma que ao final, ocorreu a formação do bioconjugado final PM/Pep-Anti-*M. leprae*-Anti-IgG/AgNP, sendo este, utilizado para realiza as medidas eletroquímicas nos eletrodos impressos pela técnica de Voltametria de Pulso Diferencial (DPV). As nanopartículas apresentaram características adequadas e satisfatórias para imunoensaios, sendo condizente com a referência. A confirmação da ligação entre o anticorpo secundário e a nanopartícula de prata, ocorreu por meio da caracterização por UV-vis. Otimizações univariadas do método foram realizadas, assim como um planejamento experimental. Com ambos, foi possível encontrar as melhores condições dentre as avaliadas, obtendo ao final uma curva ROC com o valor da área sobre a curva (AUC) de 0,813. Dessa forma, foi possível diferenciar amostras saudáveis de amostras infectadas com hanseníase multibacilar, sendo considerado um método mais barato por utilizar nanopartículas de prata como marcador eletroquímico, quando comparados com outros nanomateriais como as nanopartículas de ouro. Também pode-se considerar um método promissor para ser utilizado no diagnóstico de hanseníase.

Palavras-chave: Hanseníase, sensor eletroquímico, nanopartículas de prata, diagnóstico de doenças.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF AN ELECTROCHEMICAL DEVICE AND ITS APPLICATION IN THE DETECTION OF ANTIBODIES FOR THE DIAGNOSIS OF LEPROSY. Leprosy is a neglected tropical disease, caused by the bacteria *Mycobacterium leprae* that mainly affects the peripheral nerves, and its diagnosis is mostly carried out through clinical examination. In this work, a magneto-immunoassay was developed for the detection of anti-*M. leprae* in serum using silver nanoparticles as an electrochemical marker, aiming for its application in the diagnosis of leprosy. For this purpose, electrochemical devices were made screen-printed with carbon ink and magnets were glued to the base of each working electrode. Silver nanoparticles (AgNPs) were synthesized and characterized by both UV-visible spectroscopy (UV-vis) and Transmission Electron Microscopy (TEM). Magnetic particles (PM) modified with synthetic peptides obtained from the *M. leprae* protein 85B were used. Furthermore, the AgNPs were labeled with an anti-human IgG secondary antibody, so that the final PM/Pep-Anti-*M. leprae*-Anti-IgG/AgNP bioconjugate was formed, which is used to perform electrochemical measurements on electrodes printed using the Differential Pulse Voltammetry (DPV) technique. The nanoparticles presented adequate and satisfactory characteristics for immunoassays, being consistent with the reference. Confirmation of the connection between the secondary antibody and the silver nanoparticle occurred through UV-vis characterization. Univariate optimizations of the method were carried out, as well as experimental planning. With both, it was possible to find the best conditions among those evaluated, ultimately obtaining a ROC curve with an area over the curve (AUC) value of 0.813. In this way, it was possible to differentiate healthy samples from samples infected with multibacillary leprosy, being considered a cheaper method as it uses silver nanoparticles as an electrochemical marker, when compared to other nanomaterials such as gold nanoparticles. It can also be considered a promising method to be used in the diagnosis of leprosy.

Key-words: Leprosy, electrochemical sensor, silver nanoparticles, disease diagnosis.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Hanseníase	1
1.2	Diagnóstico de hanseníase	4
1.3	Imunoensaios e Imunoensaios	7
1.4	Peptídeos sintéticos	9
1.5	Emprego de partículas magnéticas em imunoensaios	10
1.6	Nanopartículas de prata	11
1.6.1	<i>Nanopartículas e suas características</i>	<i>11</i>
1.6.2	<i>Aplicação de nanopartículas em biossensores</i>	<i>13</i>
1.7	Dispositivos eletroquímicos descartáveis utilizados em análises clínicas	14
1.7.1	<i>Eletrodos impressos à base de carbono</i>	<i>14</i>
2	JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	17
2.1	Justificativa	17
2.2	Objetivo Geral	17
2.3	Objetivos Específicos	17
3	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	19
3.1	Materiais e soluções utilizados	19
3.2	Equipamentos	21
3.3	Síntese das nanopartículas de prata	21
3.4	Caracterização por Espectrofotometria na região do ultravioleta visível (UV-vis)	22
3.5	Caracterização por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) 22	
3.6	Histograma de distribuição dos tamanhos das AgNPs	22
3.7	Confecção dos dispositivos eletroquímicos descartáveis	22
3.8	Conjugação entre o anticorpo secundário e a nanopartícula de prata 24	
3.9	Caracterização do conjugado anti-IgG-AgNP obtido	25
3.10	Ancoragem do peptídeo à partícula magnética	25

3.11	Peptídeos sintéticos	26
3.12	Amostras de soro	27
3.13	Captura e separação do anti- <i>M. leprae</i> em amostras de soro	27
3.14	Modificação dos eletrodos de trabalho com as AgNPs	29
3.15	Planejamento Fatorial 2 ⁴ com ponto central	29
3.16	Avaliação da reprodutibilidade e repetibilidade do magneto- imunoensaio	32
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1	Reação de formação das nanopartículas de prata	33
4.1.1	<i>Caracterização por espectrofotometria na região do UV-vis</i>	34
4.1.2	<i>Caracterização das AgNPs por Microscopia Eletrônica de Transmissão e por Espectroscopia por Energia Dispersiva (EDS)</i>	35
4.2	Caracterização da formação do conjugado Ab₂-AgNP	37
4.3	Avaliação dos parâmetros experimentais referentes ao imunoensaio proposto	38
4.3.1	<i>Avaliação diluição da amostra de soro positiva</i>	39
4.3.2	<i>Avaliação do uso de diferentes eletrólitos e suas respostas de corrente</i>	40
4.3.3	<i>Avaliação da influência da quantidade Ab₂-AgNP</i>	42
4.3.4	<i>Avaliação da resposta eletroquímica variando a forma utilização dos imãs</i>	43
4.3.5	<i>Avaliação da resposta eletroquímica variando dois operadores</i>	45
4.4	Avaliação dos principais parâmetros do imunoensaio proposto utilizando planejamento fatorial 2⁴ com ponto central	46
4.5	Avaliação da repetibilidade e precisão intermediária do magneto- imunoensaio desenvolvido	52
4.6	Avaliação do imunoensaio proposto para a detecção de anticorpo anti-<i>M. leprae</i> em soro de coortes de indivíduos saudáveis e pacientes diagnósticos com hanseníase MB	53
5	CONCLUSÕES	56
6	REFERÊNCIAS	57

1 INTRODUÇÃO

1.1 Hanseníase

A hanseníase é uma doença infecciosa causada pela bactéria *Mycobacterium leprae* que pode acometer humanos e outros animais como tatus e camundongos¹. É considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) uma doença tropical negligenciada, que afeta principalmente pessoas em situação de vulnerabilidade². O Brasil definiu doenças negligenciadas como aquelas que não só prevalecem em condições de pobreza como contribuem para a desigualdade. Elas são causadas por agentes infecciosos ou parasitantes. Recebem historicamente baixa atenção por meios das indústrias devido a elas estarem presentes majoritariamente em populações de baixa renda com pequena capacidade de pagamento³.

A hanseníase apesar de não ser fatal, pode gerar sequelas irreversíveis quando não tratada corretamente, o que pode comprometer a qualidade de vida do paciente⁴. Ela é conhecida desde os tempos em que ocorreram os acontecimentos bíblicos, sendo chamada de “lepra”, termo que foi banido no Brasil, por ser considerado pejorativo, sendo então chamada de hanseníase⁵. Há relatos da doença de mais de 4.000 a.C. na China, Egito e Índia⁶. No continente americano, a doença chegou entre os séculos XVI e XVII com os colonizadores. Já no Brasil, os primeiros casos notificados ocorreram por volta de 1600, na cidade do Rio de Janeiro, onde mais tarde seria criado o primeiro “lazareto”, que seria destinado a abrigar os doentes da hanseníase⁶. Historicamente a hanseníase está relacionada a exclusão social, e no passado, o isolamento social dos doentes em colônias era considerado o único método de controle da disseminação, ocorrendo até meados do século XX⁷.

A *M. leprae* é um organismo intracelular obrigatório, ou seja, necessita de outro organismo para completar o seu ciclo de vida^{8,9}. O formato dessas bactérias é levemente curvado em forma de bastonete, medindo entre 1 a 8

µm de comprimento e 0,3 a 0,5 µm de diâmetro. Ela é um bacilo álcool-ácido resistente, sendo relatado que consegue sobreviver no ambiente por até 46 dias⁸. É uma doença infecciosa, transmissível e crônica que afeta principalmente a pele e os nervos periféricos. A bactéria invade preferencialmente as células de Schwann nos nervos periféricos, e na pele as lesões ocorrem como manchas pálidas ou erupções cutâneas. Ela acomete ambos os sexos e todas as faixas etárias que se não tratada, ou ocorrendo tardiamente, acontece a progressão lenta que pode gerar sequelas irreversíveis como deformidades e incapacidades físicas^{8,9}.

A transmissão da *M. leprae* ocorre por meio do contato prolongado com pessoas contaminadas, via gotículas de saliva que entram no organismo pelas vias respiratórias e seu tempo de incubação é considerado longo, entre 2 e 10 anos em média¹⁰⁻¹². Como essa bactéria não forma esporos, além do seu tempo longo de incubação, não é viável o seu cultivo *in vitro*, o que dificulta enormemente a produção de uma vacina¹².

A doença afeta principalmente os nervos periféricos e superficiais da pele, sendo que os sintomas variam para cada paciente de acordo com a resposta imune e grau de endemicidade que se encontra¹⁰. Podem aparecer manchas pelo corpo que tem coloração variando de mais esbranquiçadas até as mais avermelhadas e em casos mais graves podem aparecer hansenomas, que são lesões cutâneas tendendo a ser assimétricas e múltiplas, podendo ter coloração mais amarelada^{13,14}.

Com relação ao número de casos diagnosticados, em 2021, obteve a notificação de 140.594 novos casos de hanseníase, que em comparação ao ano de 2019 (202.185 novos casos), indicam uma queda considerável no número de notificações. O mesmo pode ser observado nos três primeiros países no ranking de maior número de novos casos. Em primeiro lugar está a Índia 114.437 (2019) e 75.358 (2021), em segundo lugar o Brasil 27.902 (2019) e 18,318 (2021), e em terceiro lugar a Indonésia com 17.387 (2019) e 11.106 (2021). Essa queda no número de notificações se deve principalmente à pandemia da COVID-19, que

impossibilitou as pessoas irem até os centros de saúde para passarem pelo diagnóstico, tanto devido as recomendações de isolamento social como por conta da superlotação dos centros de saúde, sendo então um contribuinte para a subnotificação da doença^{9,15,16}.

No ano de 2022, sendo os dados mais atuais, o número de novos casos mundialmente falando que foram registrados foi de 174.087, de forma que o Brasil permanece em segundo lugar no *ranking*. Entre os anos de 2013 à 2022 foram registrados 254.918 novos casos no país, ocorrendo uma redução na notificação de novos casos de 28,9%. Como mencionado anteriormente, essa queda no número de notificações se deve principalmente à pandemia da COVID-19. Em 2022 o total de novos casos notificados foram de 19.635, onde os dois estados no topo do *ranking* com maior valor de taxa de detecção por 100 mil habitantes é, o Mato grosso (MT) com 66,20 e o Tocantins (TO) 50,88 novos casos¹⁷. Portanto, visto que os números de novos casos ainda são altos, e é um problema de saúde pública, é necessário novas formas de diagnóstico eficazes tanto para os casos paucibacilares como os multibacilares e que sejam acessíveis.

A hanseníase tem cura, sendo esta recomendada pela OMS desde 1982, e é disponibilizada pelo Sistema Único de Saúde (SUS) desde 1990⁶. A Poliquimioterapia Única (PQT-U) é uma combinação de fármacos utilizado no tratamento, sendo esses: a rifampicina, clofazimina e dapsona. A duração do tratamento vai depender de cada caso, sendo de 6 meses a até 18 meses¹⁸. A OMS classificou a hanseníase em duas categorias como forma de facilitar o direcionamento do tratamento. Essas são a hanseníase Multibacilar (MB) e Paucibacilar (PB) que são classificadas de acordo com a intensidade dos sintomas². Os casos PB apresentam baixa quantidade de bacilos no organismo, portanto, são difíceis de diagnosticar por métodos sorológicos, uma vez que há baixa produção de anticorpos. Apresentam baciloscopia negativa e cinco ou menos lesões pelo corpo^{10,11}. Neste estágio o índice de bacilos é baixo e o paciente não tem capacidade de infectar outros indivíduos sendo o tempo de tratamento de

6 meses.^{9,10} Já os casos MB são caracterizados pela baciloscopia positiva e a presença de seis ou mais lesões na pele. Porém alguns pacientes manifestam sintomas apenas após um longo período de incubação, podendo apresentar apenas problemas nos nervos que podem levar a lesões irreversíveis¹⁰.

A doença está relacionada a estigma e discriminação social, sendo necessário medidas públicas de controle da doença, visto que esta afeta toda a sociedade, principalmente o paciente infectado, pois a hanseníase pode deixar sequelas permanentes que podem impossibilitar a pessoa de viver uma vida funcional¹⁹.

1.2 Diagnóstico de hanseníase

Atualmente o diagnóstico no Brasil se dá principalmente por meio do exame clínico, avaliando-se os sintomas. O profissional da saúde irá avaliar as lesões cutâneas hipopigmentadas ou manchas avermelhadas com perda parcial e/ou total da sensibilidade. Os nervos periféricos também são outra característica da doença, podendo haver a perda de sensibilidade. A baciloscopia é utilizada como diagnóstico complementar por meio do qual se coleta amostras intradermais das feridas, o que é considerado um método invasivo e que gera grande desconforto²⁰. A baciloscopia, como mencionado anteriormente, não é eficaz para diagnóstico dos casos PB, visto que eles apresentam baixa título do bacilo no organismo. Deste modo, a hanseníase pode ser dividida em:

A) *Indeterminada* (PB): é o primeiro estágio de manifestação da doença, porém nem todos os pacientes manifestam essa etapa. É identificada a partir de manchas na pele mais claras na região central, as quais podem perder sensibilidade térmica e/ou dolorosa, porém é comum manter a sensibilidade ao toque. Dessa forma, a análise por baciloscopia e biópsia (exame complementar) não são eficazes, pois podem apresentar falso negativo, não identificando o bacilo^{10,21}.

B) *Tuberculóide* (PB): a doença se manifesta na forma de manchas em alto relevo ou com a borda em relevo bem delimitado e o centro claro. Possui

o tempo de incubação de até cinco anos, podendo se manifestar mesmo em crianças de colo. Nesse estado, o sistema imune do paciente consegue destruir os bacilos espontaneamente. A baciloscopia é negativa e a biópsia quase sempre não apresenta bacilos, sendo o diagnóstico realizado a partir da avaliação das manchas^{10,21}.

C) *Dimorfa ou Borderline* (MB): é caracterizado por manchas avermelhadas ou esbranquiçadas com a borda mal delimitada em alto relevo, ou múltiplas lesões com a borda bem delimitada, semelhante as da tuberculose. Cerca de 70% dos casos de hanseníase são da forma dimorfa, com tempo de incubação longo (maior que 10 anos). Há perda parcial ou total da sensibilidade, sendo que em alguns casos pode gerar dor intensa nos nervos. O seu diagnóstico majoritariamente é realizado a partir da avaliação das lesões, porém a baciloscopia é em sua maioria positiva^{10,21}.

D) *Virchowiana* (MB): apresenta-se por manchas pouco visíveis, vermelhidão, pele ressecada, poros dilatados semelhantes a uma casca de laranja que aparecem geralmente as regiões mais quentes do corpo, como axilas e couro cabeludo. Quando evoluído, apresentam hansenomas, ocorrendo também a perda de pelos e sobrancelhas. Essa etapa é muito confundida com reumatismo e problemas de circulação. Essa é a forma mais contagiosa da doença, sendo diagnosticada a partir da baciloscopia^{10,21}.

Caso os resultados do exame clínico não sejam determinantes para o diagnóstico da doença, é realizada a baciloscopia,²¹ que é considerada uma técnica muito invasiva, que gera grande desconforto ao paciente. Além disso, ela é pouco sensível, visto que os casos PB não podem ser identificados,²².

Como para ocorrer o contágio com a doença é necessário o contato prolongado, é considerado contato com indivíduos com hanseníase, pessoas que residiram no mesmo lugar nos últimos 5 anos, sendo familiar ou não²³. Em geral, a primeira medida a ser tomada ao identificar um caso de hanseníase é ofertar a revacinação com a vacina Bacilo de Calmette e Guérin (BCG) para quem não

recebeu as duas doses antes. Ela é preparada a partir da *Mycobacterium bovis*, que é um tipo de micobactéria bovina similar a *M. leprae* e a *M. tuberculosis*. A revacinação com a BCG melhora a imunidade, tornando o indivíduo resistente ao bacilo. No Brasil, ela é obrigatória em crianças com menos de 1 ano de idade, protegendo das formas graves de tuberculose^{24,25}.

Atualmente é possível realizar o teste molecular de reação de cadeia em polimerase em tempo real (qPCR) pelo SUS, analisando amostras de pele e nervos. Exames PCR são bem eficientes em detectar diversas doenças, apresentando melhores resultados em identificar casos PB²⁶. Porém esse teste é indicado para uso exclusivo de pacientes confirmados com hanseníase, monitorando se o bacilo está se reproduzindo e presente na amostra²⁷. Além do mais, é uma técnica com custo atribuído elevado, devido a diversos fatores como necessidade de equipe treinada e laboratório de análises centralizado. Dessa forma, o exame é solicitado apenas nos casos em que os demais exames foram inconclusivos, sendo pouco utilizado na prática clínica.

Além da técnica de PCR, há outras técnicas na literatura, como o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA, do inglês *enzyme-linked immunosorbent assay*) e os testes imunocromatográficos, também chamados de ensaios de fluxo lateral (LFA, do inglês *lateral flow assays*)^{28,29}. Na abordagem via ELISA, uma alíquota da amostra contendo o antígeno é adicionada no anticorpo de fase sólida, ocorrendo a ligação entre os dois. Após a lavagem é adicionado um anticorpo marcado com a enzima formando um complexo. A quantidade de produtos gerado é proporcional à quantidade de antígeno na amostra³⁰. Atualmente essa técnica é eficaz e apresenta bons resultados para hanseníase MB, porém para os casos PB possui baixa capacidade de identificação^{31,32}.

O LFA, conhecido como teste rápido, é aplicado de forma comercial para diagnóstico de diversas doenças. Possui tempo de análise que dura em torno de 15 minutos, e não necessita de pessoal qualificado para coleta e interpretação

dos resultados. Utilizam uma membrana de nitrocelulose onde a amostra irá percorrer, atingindo a linha de teste, que estão os reagentes, o alvo irá de ligar e caso o teste seja positivo, irá aparecer uma linha colorida³³⁻³⁵. Para a hanseníase, esse teste é limitado para os casos PB devido à baixa quantidade de anticorpos, gerando alta taxa de falsos-negativos. Portanto, esse teste é utilizado principalmente para identificar os casos MB, mas não tem se mostrado efetivo³⁶.

Dessa forma, apesar de haver técnicas capazes de gerar o diagnóstico da hanseníase, em sua maioria, estas possuem alguma eficácia para o diagnóstico dos casos MB. Além disso, muitas delas necessitam de pessoal qualificado, algumas muito invasivas e possuem longo tempo de resposta. Portanto, faz-se necessários novos métodos para diagnóstico rápido da hanseníase e, preferencialmente, capazes de classificar os pacientes em PB e MB.

1.3 Imunoensaios e Imunossensores

Imunodiagnóstico é um termo utilizado para designar o diagnóstico laboratorial realizado com uso de técnicas imunológicas que buscam revelar a presença de anticorpos ou antígenos no organismo do paciente³⁷. De forma geral, imunoensaios são métodos baseados na interação entre anticorpo e antígeno. Anticorpos são produzidos por plasmócitos, originados dos linfócitos B ativados. Já os antígenos são toda estrutura capaz de reagir com células do sistema imune ou interagir com anticorpos³⁷. Qualquer espécie que gere uma reação no sistema imune pode ser considerado antígeno, como substâncias (toxinas) até patógenos (vírus, bactérias, fungos)^{38,39}.

O anticorpo ou imunoglobulina (Ig) possui sua estrutura dividida em forma de Y, sendo dois polipeptídeos pesados idênticos, e duas cadeias polipeptídicas leves idênticas, que são unidas por meio de ligação de dissulfeto. Cada anticorpo é constituído por uma região contante e uma variável, no qual a constante é similar em todos os anticorpos de mesma classe⁴⁰. Já na região variável ocorre a ligação com ao antígeno, que pode se ligar especificamente a

duas moléculas de uma vez³⁸. Na FIGURA 1.1 é possível observar a estrutura de um anticorpo.

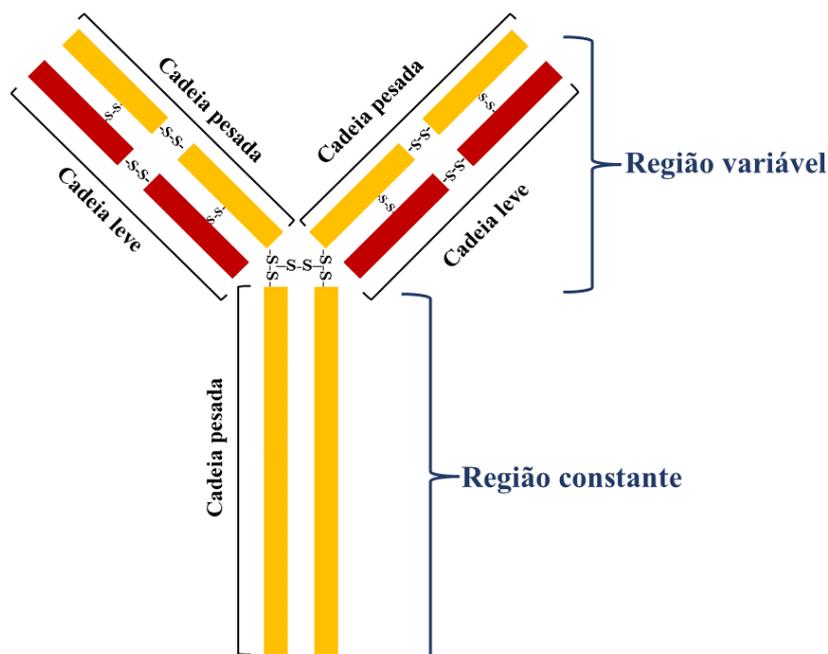


FIGURA 1.1 - Estrutura de um anticorpo, sendo as cadeias leves representadas em vermelho e em amarelo as cadeias pesadas, ligadas por pontes de dissulfeto (-S-S-).

Fonte: Adaptado de Kellie e Al-Mansour⁴¹ e Valle de Almeida⁴².

Os cinco principais isótopos de anticorpos são o IgG, IgM, IgA, IgE e IgD, destes as classes mais comuns são: o IgG para infecções mais antiga e o IgM para as mais recentes⁴⁰. O IgG é caracterizado pela meia-vida sérica longa, além de serem os anticorpos mais abundantes⁴³. O IgA tem o papel de proteger as secreções da mucosa em sua forma dimérica, mas também é encontrado na circulação sanguínea. O IgM está presente nas funções complementares do sistema imunológico e combate antígenos invasores. Já o IgE está presente no soro nas menores concentrações, estando associado a reações de hipersensibilidade. E o IgD, também encontrado na circulação sanguínea, tem seu papel na resposta imunológica em grande parte desconhecida⁴⁴⁻⁴⁶.

No caso de biossensores, faz-se o uso de processos de reconhecimento biológico podendo fazer uso de enzimas, antígenos, anticorpos, ou material genético como DNA ou RNA, entre outros. Ao interagir com o analito uma resposta é gerada podendo envolver processos de variação de massa, ou uma

resposta elétrica, térmica ou óptica e um transdutor irá transformar está em um sinal elétrico que poderá ser mensurado e correlacionado com a concentração do analito. No caso do uso de antígenos ou anticorpos como elemento de biorreconhecimento o qual irá levar a formação de um complexo imune com o analito temos um Imunossensor⁴⁷. Tais biossensores tem vantagens como a sua facilidade de produção, serem rápidos e portáteis. Possuem alta especificidade e baixos limites de detecção⁴⁸, sendo aplicados em análises ambientais⁴⁹, forense⁵⁰, detecção de contaminantes em alimentos⁵¹, análise de vírus⁵², entre outras. Atualmente os biossensores são utilizados majoritariamente na área da saúde, para diagnosticar, tratar e monitorar doenças, utilizando amostras de saliva, sangue e urina⁴⁸.

Os métodos que visam a detecção de anticorpos ou antígenos são conhecidos genericamente por imunoensaios ou “teste sorológico” independentemente do tipo de amostra que será utilizada, podendo ser analisadas amostras de sangue, plasma ou soro^{53,54}. Imunoensaios desenvolvidos para o diagnóstico de hanseníase envolvem comumente o alvo PGL-I e seus anticorpos anti-PGL-I. Para os casos MB é considerado eficiente os testes de PGL-I e o mesmo não pode ser dito para os casos PB, que não apresentam alta sensibilidade. Em zona endêmicas, pacientes saudáveis podem apresentar anticorpos anti-PGL-I e esse teste pode gerar alta taxa de falsos-positivos por esse motivo⁵⁵. Também indivíduos com tuberculose, que é causada pela *Mycobacterium tuberculosis*, podem apresentar alta taxa de falsos diagnósticos devido à grande chance de reação cruzada e ao fato de as bactérias serem parecidas. Proteínas recombinantes e peptídeos sintéticos como antígenos podem ser uma forma de se detectar anticorpos anti-*M. leprae*⁵⁶.

1.4 Peptídeos sintéticos

Os peptídeos são moléculas orgânicas formadas por dois ou mais aminoácidos ligados em cadeia, possuindo massa molecular menor que 6 kDa. A ligação entre aminoácidos é nomeada de ligação peptídica formada pela ligação

covalente entre a carboxila de um aminoácido e o grupo amina de outro. Quando um peptídeo é formado por mais de 50 aminoácidos e apresenta massa molecular maior que 6 kDa ele passa a ser considerado uma proteína^{57,58}.

Os peptídeos são muito interessantes para aplicações em imunoenaios, eles mimetizam regiões específicas de epítomos de proteínas antigênicas, assim evitando a interação com regiões não específicas. Isso aprimora a sensibilidade e especificidade, gerando maior eficiência do ensaio⁵⁹. O grande interesse no uso de peptídeos sintéticos ocorre quando a proteína antigênica de interesse não se encontra disponível, como para a *M. leprae* que não pode ser cultivada *in vitro* devido ao seu longo tempo de incubação. Assim, evitando ainda processos morosos e complicados de produção de proteínas recombinantes, é possível empregar peptídeos sintéticos derivados das sequências de aminoácidos das proteínas antigênicas específicas, como no caso da *M. leprae*, na detecção de anticorpos^{42,60-62}.

O antígeno 85 é um complexo formado por três proteínas (85A, 85B e 85C) presente em todas as micobactérias^{63,64}. O antígeno 85B é o mais abundante na *M. leprae*⁶⁵. Alban *et al.* (2014), conseguiu detectar o anticorpo da *M. leprae* MB em 73,9% dos pacientes que participaram, tendo utilizado a técnica ELISA. Porém para os casos PB não houve resposta positiva, se mostrando pouco eficiente identificando cerca de 30% dos casos⁶⁶.

Desta forma, o uso de peptídeos sintéticos é uma forma de diminuir os custos e permitir a seletividade e sensibilidade do método, permitindo o desenvolvimento de um dispositivo capaz de detectar a *M. leprae* visando o diagnóstico da hanseníase.

1.5 Emprego de partículas magnéticas em imunoenaios

Partículas magnéticas (PM) vem sendo utilizadas em imunoenaios como forma de permitir a captura e separação magnética do analito dos demais compostos da amostra. Essa captura e separação é possível devido à grande área superficial das PMs e também devido a possibilidade de funcionalização da

superfície como bioreceptores⁶⁷. Com PMs funcionalizadas com ligantes específicos, é possível fazer a captura do alvo e, com auxílio de um ímã, é possível realizar a separação magnética deste da matriz da amostra. Com isto, é possível eliminar os interferentes, o que pode levar a métodos com elevada seletividade, além disto, é possível realizar a pré-concentração do analito o que pode levar a baixos limites de detecção⁶⁸.

Ecke *et al.* desenvolveu um método eficiente, além de rápido e preciso, baseado em um magneto-imunoensaio (ensaio imunológico utilizando partículas magnéticas) para a detecção de diclofenaco em água. Os resultados foram promissores, com limite de detecção de 400 ng/L e com bons resultados quando comparado com os resultados obtidos com a técnica de LC-MS/MS⁶⁹. Já os autores Fernández *et al.* (2020), propuseram um magneto-imunoensaio do tipo sanduíche para a detecção de procalcitonina (PCT) em amostras de soro. A PCT que é um marcador de inflamação utilizado para diagnóstico de infecções bacterianas⁷⁰. Nesse trabalho, utilizou-se também os eletrodos serigrafados descartáveis, obtendo limites de detecção de 0,1 ng/mL com uma faixa de trabalho de 0,5 – 1000 ng/mL, sendo considerado adequado para concentrações clinicamente relevantes⁶⁹.

As partículas magnéticas permitem a otimização dos resultados, visto que as suas propriedades favorecem a eliminação de interferentes de forma efetiva, por meio da captura do alvo na partícula. Além disso é possível gerar uma pré-concentração do alvo, assim havendo a amplificação do sinal analítico.

1.6 Nanopartículas de prata

1.6.1 Nanopartículas e suas características

Devido as diversas propriedades químicas e eletrônicas que as nanopartículas (NPs) metálicas possuem, têm representado grande potencial científico e tecnológico. As NPs possuem características como óptica, catalítica, eletrônica e magnética que são favorecidas devido a maior área superficial da

nanopartícula, que permitem a funcionalização de sítios ativos, estabilidade e capacidade de adsorção. As NPs em geral possuem tamanhos entre 1 e 100 nm de tamanho^{71,72} e muitas de suas propriedades são dependentes do tamanho. Isso pode ser observado por meio da coloração da dispersão, a qual tem origem na excitação dos elétrons com sob irradiação no visível resultando na oscilação coletiva dos elétrons de condução. Esse fato induz a formação de momentos de dipolo causados pelo carregamento da superfície. Com o aumento do tamanho das partículas, a banda de plasmon de superfície torna-se mais larga e se desloca para comprimentos de onda maiores. É visto também que pequenas mudanças na forma da partícula, pode alterar consideravelmente a cor da dispersão⁷³.

As NPs são preparadas usualmente por duas rotas, sendo elas a síntese física e a síntese química. A síntese física utiliza métodos como evaporação, condensação e ablação a laser. Via síntese química os íons metálicos são reduzidos formando pequenos aglomerados ou agregados metálicos⁷⁴⁻⁷⁶. Estudos mostraram que o uso de um redutor forte, como o borohidreto de sódio, leva a formação de partículas menores e monodispersas, mas para se obter partículas maiores com baixa dispersão, é mais difícil de controlar. Redutores mais fracos como o citrato possuem uma menor capacidade de redução, mas a distribuição de tamanho não era limitada^{74,77}. Outro fator de importância é o uso de estabilizantes, utilizados para evitar a aglomeração das nanopartículas⁷⁸.

As nanopartículas de prata (AgNPs) possuem diversas propriedades, dentre elas está a sua capacidade ampla de ação contra microorganismos como bactérias, fungos e vírus. A prata age na eliminação de bactérias via danos causados na membrana celular, interrompendo a função das enzimas e grupos de ácidos nucleicos nas proteínas e no DNA da bactéria⁷⁹. Além disso, a prata apresenta menor toxicidade contra células animais e menor custo em comparação a outras NPs como a de ouro⁸⁰. As AgNPs possuem outras propriedades como boa estabilidade química, maleabilidade, elevada condutividade elétrica e térmica e

possui interessantes atividades como catalizador. As AgNPs estão presentes na indústria de alimentos, têxtil, farmacêutica, agrícola, entre outras^{74,81}.

Na literatura são descritas diversas procedimentos para a síntese de nanopartículas de prata, incluindo métodos que atendem aos princípios da Química Verde⁸². A síntese normalmente ocorre por meio de reações de oxido-redução, que utilizam solventes orgânicos ou o borohidreto de sódio como agente redutor, além de surfactantes e polímeros como agentes estabilizantes^{82,83}.

1.6.2 Aplicação de nanopartículas em biossensores

A utilização de nanopartículas em biossensores para a detecção de doenças veio para superar algumas limitações que esses tinham. Como mencionado anteriormente, devido as propriedades óticas, elétricas, e estruturais das nanopartículas foram desenvolvidos diversos biossensores para detecção dos mais variados tipos de analitos e que possuem alta sensibilidade e seletividade. Uma utilização muito comum dos nanomateriais a base de metais envolve a modificação da superfície eletródica que ocorrem após a ligação do analito biomolecular⁸⁴.

Nanomateriais de metais nobres como ouro, prata e platina são altamente empregados devido as suas propriedades, ao tamanho relativamente pequeno, biocompatibilidade e são facilmente modificados^{85,86}. As nanopartículas de ouro (AuNPs) são muito utilizadas atualmente em biossensores, principalmente pela facilidade de modificação da superfície do ouro, utilizando o grupo tiol, por meio da ligação ouro-enxofre. Com relação as aplicações em eletroquímica, a condutividade das AuNPs é útil quando as biomoléculas de interesse estão em quantidades pequenas e por consequência, o sinal eletroquímico é baixo. Como as AuNPs possuem excelente condutividade elétrica, são muito utilizadas na modificação da superfície eletródica para a detecção de biomoléculas permitindo obter métodos com alta sensibilidade⁸⁶.

As AgNPs também tem sido utilizadas em biossensores, pois além de seu custo atribuído ser menor em relação ao ouro, possui um coeficiente

de extinção mais elevado. Ademais, possuem propriedades óticas, eletrônicas e capacidade de modificação de sua superfície com grupos funcionais, capazes de imobilizar biomoléculas alvo, como proteínas⁸⁷. Hao *et al.* procedeu com sintetize de nanopartículas de prata e funcionalizou a sua superfície com anticorpos de uma amostra de proteína modelo. Ele também utilizou eletrodos impressos para a detecção eletroquímica por voltametria de pulso diferencial (DPV) e obteve baixos limites de detecção, sendo um método considerado rápido e de baixa complexidade⁸⁸.

Sendo assim, as AgNPs apresentam-se como promissoras para a utilização em biossensores, sendo uma opção de baixo custo e obtendo resultados com baixo limite de detecção, de forma rápida e simples.

1.7 Dispositivos eletroquímicos descartáveis utilizados em análises clínicas

1.7.1 Eletrodos impressos à base de carbono

Dentro de dispositivos para detecção de biomarcadores visando o diagnóstico de doenças, um dos grandes desafios é obter respostas rápidas, precisas e sensíveis. Os Eletrodos impressos de carbono (SPEs, do inglês *Screen printed electrodes*) têm sido muito utilizados devido serem portáteis e de baixo custo para sua produção. Além disso, apresentam boa reprodutibilidade podendo ser utilizados em diferentes tipos de aplicações, além de serem descartáveis e necessitarem de pouca quantidade de amostra⁸⁹⁻⁹².

Há diversas técnicas que podem ser utilizadas para a produção de um SPE, sendo a serigrafia uma delas e a mais utilizada⁹³⁻⁹⁵. Ela consiste em depositar um filme de uma tinta condutora sobre um substrato que pode ser papel, cerâmica ou um material polimérico, onde uma tela ou estêncil com o formato do eletrodo é colocado sobre o substrato e a tinta é espalhada. Após esta etapa a tela é removida e a tinta condutora deverá passar por um processo de cura⁹⁶. Há diferentes fabricantes de SPEs^{97,98}, porém devido ao baixo custo além de ser

considerado de baixa complexidade a sua confecção, tem-se optado por produzi-los de forma que possam ser feitos em grande escala.

No trabalho de Gomes *et al.*, foi produzido eletrodos impressos utilizando estênceis com o modelo dos sensores que foram previamente projetados em programa AutoCAD. Uma tinta condutora de carbono foi aplicada sobre o estêncil posicionado sobre o substrato, que no caso foi utilizado uma folha de poliéster. Os eletrodos produzidos apresentaram resultados promissores para a detecção de poluentes emergentes, no caso o nonilfenol e a paroxetina, simultaneamente⁹⁹. Outro exemplo é o trabalho de Catunda *et al.*, em que eletrodos impressos foram produzidos por serigrafia e, desta vez, direcionados para o uso na detecção por fotoeletroquímica de biomarcadores visando o diagnóstico de doenças. Nesse trabalho, foi utilizado os SPEs para a detecção de RNA do vírus SARS-Cov-2 em amostras de saliva¹⁰⁰.

A modificação de eletrodo obtidos por SPE também é possível, podendo ser utilizado nanopartículas metálicas ou magnéticas, outros nanomateriais e polímeros condutores, como forma de melhorar a sensibilidade e estabilidade do dispositivo^{48,101}.

A serigrafia é uma técnica simples e barata que pode ser utilizada para produção de SPE em larga escala, além de ser possível a construção de dispositivos com diferentes formatos, como pode ser observado na FIGURA 1.2. Os diferentes modelos utilizados permitem maior eficiência na obtenção de resultados, visto que no caso de arranjos contendo 8 células eletroquímicas por exemplo, é possível ser avaliados 8 analitos diferentes de forma simultânea, ou obter 8 réplicas. Além disso o consumo de reagentes e amostras é muito menor do que em células convencionais¹⁰².

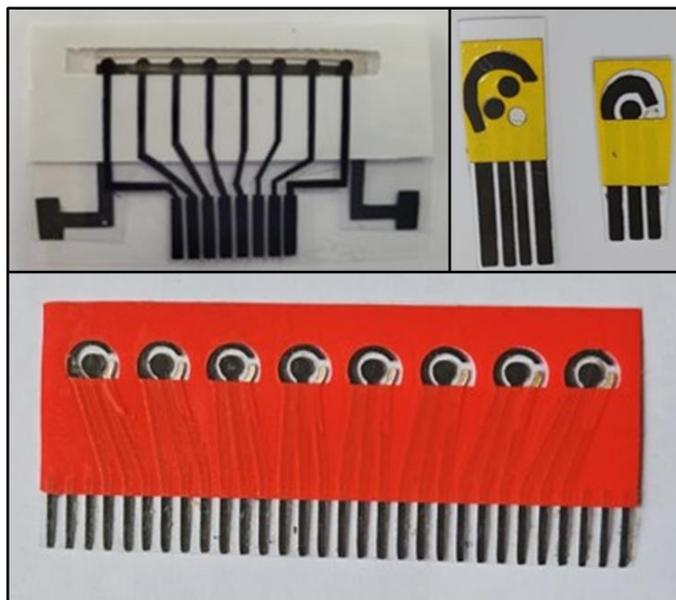


Figura 1.2 - Eletrodos serigrafados em diferentes formatos.

Fonte: A autora.

Sendo assim, eletrodos impressos possuem diversas aplicações e tem se tornado promissores para a detecção do analito, tendo várias possibilidades de uso. Devido ao baixo consumo de amostra e reagentes, além de capacidade de automação, são indicados para o desenvolvimento de um dispositivo de baixa complexidade para a detecção de hanseníase. Dessa forma, se torna um objeto que pode ser utilizado por pessoal não qualificado, permitindo o diagnóstico em regiões remotas.

2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

2.1 Justificativa

A hanseníase é uma doença infecciosa que afeta principalmente pessoas em situação de vulnerabilidade social, e que pode deixar sequelas irreversíveis, impossibilitando o paciente de viver uma vida funcional novamente. O Brasil é o segundo país com maior número de novos casos, sendo considerado um problema de saúde pública. O diagnóstico precoce é importante pois a doença tem cura e neste estágio o paciente não está transmitindo a doença. No entanto, não há um teste eficiente para o diagnóstico da hanseníase PB e mesmo para a MB o que leva muitas pacientes a ter o diagnóstico quando já há sequelas incapacitantes. Portanto, faz-se necessário o desenvolvimento de novos métodos que possam auxiliar o diagnóstico da hanseníase e seja de simples e de baixo custo, que possa ser utilizado no SUS inclusive em regiões remotas.

2.2 Objetivo Geral

O objetivo desse trabalho foi desenvolver um magneto-imunoensaio baseado em um peptídeo sintético imunodominante da proteína 85B da *M. leprae* para a captura e separação de anticorpos anti-*M. lepraei* em amostras de soro, utilizando nanopartículas de prata como marcador eletroquímico e um dispositivo eletroquímico descartável multicanal, visando o diagnóstico sorológico de hanseníase.

2.3 Objetivos Específicos

- Funcionalizar partículas magnéticas com o peptídeo sintético anti-*M. Leprae*
- Sintetizar nanopartículas de prata em laboratório conforme a metodologia descrita;
- Realizar a funcionalização das AgNPs com o anticorpo secundário;
- Construção dispositivo 8 eletrodos descartáveis a base de carbono;

- Desenvolver um magneto-imunoensaio utilizando o peptídeo sintético para a captura do anticorpos anti-*M. leprae* e as AgNPs como marcador eletroquímico;
- Investigar as melhores condições do imunoensaio visando maior diferenciação entre amostras de soro de indivíduos saudáveis e pacientes diagnosticados com hanseníase;
- Avaliar a resposta do imunoensaio proposto sempre as coortes de pacientes diagnosticados com hanseníase e de indivíduos saudáveis.

3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 Materiais e soluções utilizados

a) Reagentes para a síntese das AgNPs (TABELA 3.1):

TABELA 3.1 - Reagentes utilizados no preparo das AgNPs.

Nome	Sigla	Pureza	Marca
Nitrato de prata	AgNO ₃	99,8%	Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA)
Borohidreto de sódio	NaBH ₄	98,0%	Dinamica

As soluções de AgNO₃ 2 mmol/L e de NaBH₄ 3 mmol/L foram preparadas em água ultrapura obtida do purificador Milli-Q (Millipore, Bedford, EUA).

b) Materiais para a construção dos dispositivos descartáveis:

- Vinil adesivo adquirido no mercado local;
- Pasta de carbono da marca SunChemical;
- Tinta de Ag/AgCl SunChemical.
- Folha de poliéster (transparência para impresso laser);

c) Materiais para a funcionalização da AgNP com o anticorpo secundário (Ab₂) (TABELA 3.2):

TABELA 3.2 - Reagentes necessários para a conjugação do anticorpo secundário na AgNP.

Nome	Sigla	Pureza	Marca
Glutathiona	GSH	99,0%	Sigma-Aldrich
Fosfato de sódio dibásico	Na ₂ HPO ₄	99,96%	J.T.Baker
Fosfato de potássio monobásico	KH ₂ PO ₄	99,0%	Merck
Glutaraldeído	-	25%	Sigma-Aldrich
Rabbit anti-human IgG	Ab ₂	-	Abcam

As soluções para essa etapa em sua maioria utilizaram somente água, com exceção da solução do anticorpo Ab₂ 1 µg/mL, que foi utilizado o tampão fosfato (TF) 0,01 mol/L em pH 7,4. Para o tampão TF 0,1 e 0,01 mol/L pH 7,4 foram preparadas com os sais Na₂HPO₄ e KH₂PO₄, sendo o pH corrigido com a utilização de um pHmetro.

d) Materiais para a modificação da partícula magnética com o peptídeo sintético (TABELA 3.3):

TABELA 3.3 - Lista de materiais utilizados na modificação das partículas magnéticas com o peptídeo sintético e para o preparo do branco.

Nome	Abrev.	Pureza/ concentração	Marca
Partícula magnética	PM	10 mg/mL (diam: 1,0 µm)	Thermo Fisher Scientific
N-Hidroxisuccinimida	NHS	98,0%	Sigma-Aldrich
Tween® 20	Tw	-	Sigma-Aldrich
Etanolamina	-	≥ 99%	Synth
Ácido 2-(N-morfolino) etanossulfônico	MES	99,5%	Sigma-Aldrich
N-etil-N'-(3- dimetilaminopropil) carbodiimida	EDC	-	Sigma-Aldrich

A solução de MES foi preparada em água, corrigindo o pH para 5,2. A solução de EDC/NHS foi realizada primeiramente com o preparo da solução de NHS em TF 0,01 mol/L em pH 7,4 e retirado 1 mL dessa solução sendo adicionado no EDC. A solução de etanolamina e TF-Tw foram realizadas também em TF 0,01 mol/L pH 7,4.

e) Preparo do branco:

Para o preparo do branco utilizou-se o soro de bezerro estéril da marca Sigma-Aldrich na diluição 1:50, mesma diluição utilizada para a amostra MB usada no imunensaio.

3.2 Equipamentos

Os equipamentos utilizados durante o projeto constam na TABELA 3.4.

TABELA 3.4 - Relação de equipamentos utilizados no desenvolvimento do trabalho.

Nome	Modelo	Marca
Espectrofotômetro UV-VIS	2550	Shimadzu
Agitador magnético	Color squid	IKA®
Microscópio Eletrônico de Transmissão	Magellan 400 L	FEI
Centrífuga	Mikro 220R	Hettich
Multipotenciostato	Microstat8000	Dropsens

3.3 Síntese das nanopartículas de prata

Para a síntese das AgNPs, seguiu-se o procedimento descrito por Hao et al. (2011)⁸⁸. A formação das nanopartículas de prata então se iniciou com o resfriamento da solução AgNO_3 no refrigerador e foi posteriormente transferido para uma bureta de 10 mL. Já com a solução de NaBH_4 , um volume de 40 mL foi transferido para um Erlenmeyer onde foi mantida em constante agitação em banho de gelo. A reação iniciou-se com o gotejamento lento do AgNO_3 sendo que ao final do gotejamento, o Erlenmeyer foi retirado do banho de gelo e mantido sob agitação de 400 rpm durante 30 minutos. Ao final a suspensão das nanopartículas formadas foi transferida para um tubo falcon de 50 mL envolvido com papel alumínio para garantir que as AgNPs não teriam contato com a luz e foram armazenadas a 4°C. Toda a reação de síntese foi realizada na ausência de luz.

3.4 Caracterização por Espectrofotometria na região do ultravioleta visível (UV-vis)

Para essa caracterização foi utilizada a diluição 1:5 da dispersão das AgNPs, misturando-se 200 μL das nanopartículas e 800 μL de água. A dispersão foi analisada em uma cubeta de quartzo de 100 μL entre os comprimentos de onda 200 a 750 nm. Para a análise do branco foi utilizado a água ultrapura.

3.5 Caracterização por Microscopia Eletrônica de Transmissão

Para a caracterização por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) foi utilizado 10 gotas da dispersão das AgNPs que foram colocadas no grid utilizado. As AgNPs foram gotejadas diretamente no filme de carbono amorfo que é sustentado por uma grade de cobre, onde posteriormente foi aguardado a secagem do filme em temperatura ambiente e por fim encaixado no equipamento e iniciado as caracterizações.

3.6 Histograma de distribuição dos tamanhos das AgNPs

Para a avaliação da distribuição dos tamanhos das AgNPs e construção do histograma foi utilizada as imagens obtidas pela caracterização por MET e verificou-se os diâmetros das nanopartículas. Para determinar aos diâmetros isto foi utilizado o programa ImageJ.

3.7 Confecção dos dispositivos eletroquímicos descartáveis

Para a detecção eletroquímica, utilizou-se um dispositivo descartável composto por um arranjo com 8 células eletroquímicas compostas cada uma de um eletrodo de trabalho, um contra eletrodo e um eletrodo de referência. Nesse arranjo cada célula se comporta de forma independente.

Os dispositivos foram construídos conforme descrito por Afonso *et al.* (2016). Para a construção dos eletrodos impressos de carbono, foi definido o desenho dos eletrodos e o vinil adesivo foi cortado e utilizado na serigrafia dos arranjos assim como as máscaras utilizadas na delimitação da área eletroativa.

Para isto, foi utilizado a impressora de corte eletrônica doméstica e o programa Silhouette Studio para o desenho e os cortes. As etapas de construção são representadas na FIGURA 3.1. Inicialmente, o desenho do molde foi recortado em uma folha de vinil adesivo, (etapa A), e com uma pinça foi removido as partes do vinil não desejadas, formando o molde negativo. Após, foi transferido o vinil adesivo para o substrato, sendo esse, uma folha de poliéster (etapa B). A partir disso se iniciou a etapa de serigrafia (etapa C), com o auxílio de uma seringa, foi aplicado a tinta condutora de carbono e espalhada sobre a folha com uma espátula. Foi então levado para a cura da tinta em estufa, por 1 hora a 90°C. Em seguida, etapa D, a tinta de Ag/AgCl foi aplicada, utilizando um pincel, para preparar os eletrodos de referência e a cura realizada em estufa por 30 minutos a 60°C. Posteriormente, foi retirado o vinil adesivo do poliéster, obtendo os arranjos de eletrodos e a área delimitada em que ocorreu as medidas eletroquímica, com a utilização de uma máscara também cortada na impressora de corte e utilizando o mesmo vinil adesivo (etapa E). Por fim, foi recortado o excesso de poliéster ao redor dos arranjos e finalizado a confecção dos SPCE¹⁰².

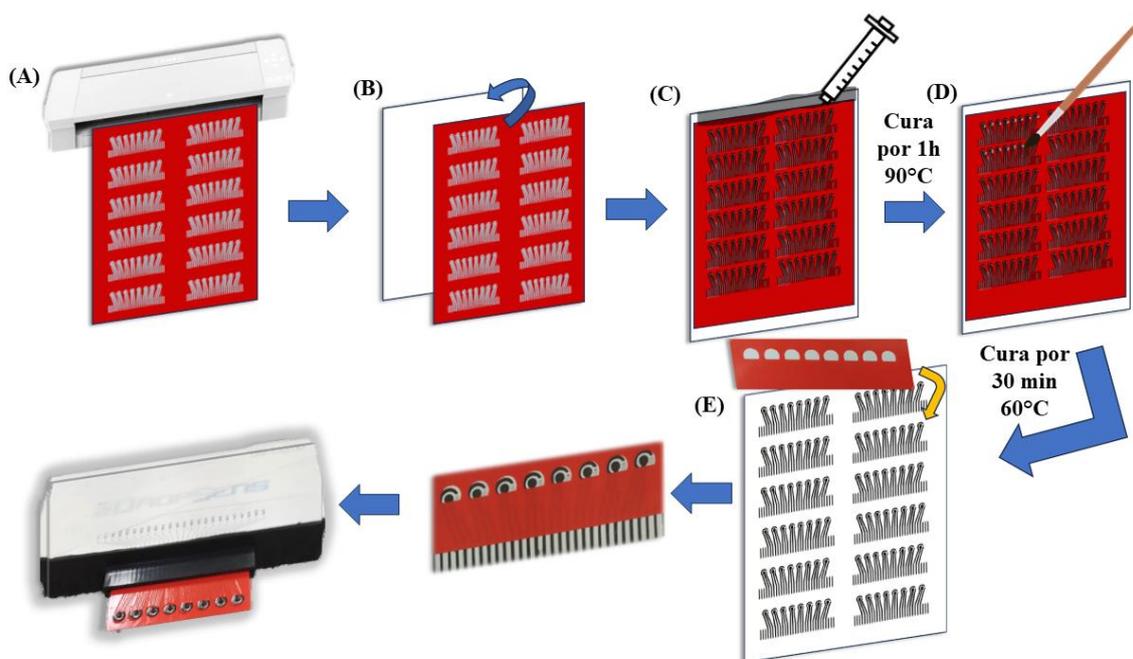


FIGURA 3.1 - Fabricação dos dispositivos contendo o arranjo com os 8 eletrodos de trabalho, referência e auxiliar.

Fonte: A autora.

3.8 Conjugação entre o anticorpo secundário e a nanopartícula de prata

Para a formação do bioconjugado final é necessário a funcionalização da a AgNP com o anticorpo secundário, sendo utilizado o anti-IgG humano. Para isso seguiu-se o procedimento descrito por Hao et al. que está esquematizado na FIGURA 3.2⁸⁸. Iniciou-se com a transferência de 1 mL da dispersão das AgNPs para um microtubo de 2 mL, e então adicionou-se 20 µL da solução de glutathiona (GSH) 0,1 mg/mL tendo a função de modificar a superfície das nanopartículas com grupos tiol. Foi incubado por 1 hora à temperatura ambiente em agitação lenta e constante. Após isto, foi adicionado mais 117 µL de TF 0,1 mol/L e pH 7,4, para manter o pH constante, no microtubo e incubado por mais 1 hora nas mesmas condições. As partículas foram lavadas 3 vezes utilizando o TF 0,01 mol/L e pH 7,4 utilizando uma centrífuga na rotação de 14.000 rpm por 15 minutos a cada lavagem. As partículas foram ressuspensas para 500 µL em TF 0,01 mol/L, pH 7,4 e adicionado 500 µL do anti-IgG humano (1 µg/mL) mais 250 µL de glutaraldeído 0,5%. O glutaraldeído foi adicionado para auxiliar na ligação entre o anti-IgG humano e a AgNP, reticulando-os¹⁰³. A mistura foi incubada por 1 hora a 37°C em 400 rpm, sendo posteriormente as partículas lavadas da mesma forma que foi anteriormente, sendo ao final ressuspensas para 1 mL em TF 0,01 mol/L e pH 7,4.

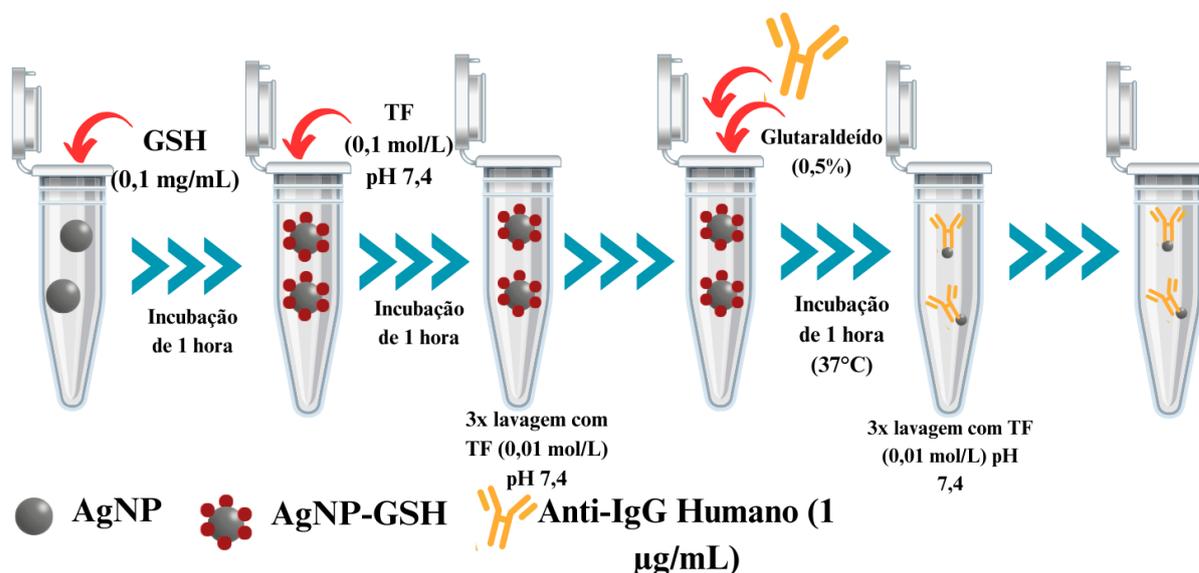


FIGURA 3.2 - Etapas para a conjugação entre AgNP e o anti-IgG humano.

Fonte: A autora.

3.9 Caracterização do conjugado anti-IgG-AgNP obtido

Para que fosse verificado se realmente ocorreu a conjugação entre o anticorpo secundário Anti-IgG humano e a AgNP, foi realizado a caracterização a partir da Espectrofotometria de UV-visível. Para isso se utilizou a diluição 1:5 do conjugado AgNP/Ab₂, sendo realizada a varredura entre os comprimentos de onda 200 a 600 nm, em uma cubeta de quartzo de 100 µL. Para a varredura do branco foi utilizado a água ultrapura.

3.10 Ancoragem do peptídeo à partícula magnética

A ancoragem do peptídeo sintético nas PMs foi realizada de acordo com o protocolo do fabricante das partículas¹⁰⁴. Na FIGURA 3.3 são apresentadas etapas do processo.

O procedimento se iniciou com a lavagem das PMs com o tampão MES 50 mmol/L pH 5,2, sendo utilizado a separação magnética por meio de ímãs de neodímio. Em seguida, foi realizada a ativação dos grupos carboxílicos na superfície das PMs utilizando 1 mL da solução de EDC (0,4 mol/L)/NHS (0,1 mol/L), mantido em agitação suave em um agitador rotativo por 30 minutos. O EDC tem a função de ativar os grupos carboxílicos presentes na superfície das

PMs promovendo a ligação entre os grupos carboxílico nas partículas e os grupos amina do EDC. A utilização do NHS vem para estabilizar essa nova estrutura que é muito instável.

Foram realizadas 3 repetições de lavagens com tampão MES (50 mmol/L pH 5,2) e então adicionou-se o peptídeo sintético (10 µg/mL) e manteve-se sob agitação por 24 horas no agitador rotativo. Em seguida, foi lavado novamente 3 vezes com TF contendo Tween-20 0,05% (m/v) para a remoção dos peptídeos não ancorados às PMs. Após, foi adicionado 1 mL de etanolamina (1 mmol/L) que por ser uma molécula pequena, utiliza-se para o bloqueio dos sítios de ligação não específicos e agitado por 1 hora, sendo lavado 3x com TF-Tween 20 0,05% v/v. O bioconjugado foi suspenso em 1 mL neste mesmo tampão e armazenado a 4°C por até 21 dias⁴².

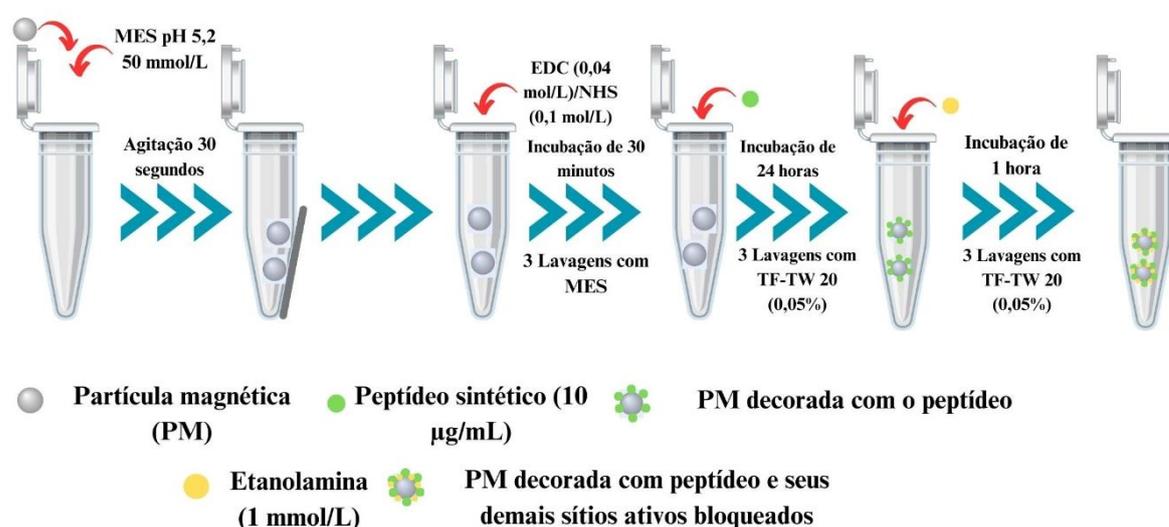


FIGURA 3.3 – Etapas envolvidas na imobilização covalente do peptídeo sintético nas partículas magnéticas.

Fonte: A autora.

3.11 Peptídeos sintéticos

O peptídeo APDDPAWQNIFNLRR (95% de pureza) é derivado de uma parte da sequência de aminoácidos da proteína 85B (patente BR1020150047800). O peptídeo sintético adquirido foi aliqotado em água e

armazenado à -20°C até o uso, sendo diluído em PBS pH 7,4 na concentração desejada.

3.12 Amostras de soro

Para a obtenção do soro, as amostras de sangue foram coletadas e centrifugadas por 10 minutos a 1000 rpm em temperatura ambiente. O soro foi armazenado à -20 °C até o uso e todos os experimentos foram realizados de acordo com a Declaração de Helsinque de princípios éticos e aprovado pelo Comitê de Ético em Pesquisa em Humanos (n° 1080.005.11.02, CEP/SD).

3.13 Captura e separação do anti-*M. leprae* em amostras de soro

Para a captura e separação da anti-*M. leprae* se utilizou 20 µL da PMs modificada com o peptídeo sintético e 300 µL da diluição 1:50 de uma amostra de indivíduo positivado para hanseníase MB, sendo esta diluição já estudada pelo grupo. Para o branco foi utilizado o soro de bezerro na mesma diluição. A mistura foi colocada em um agitador rotativo e deixado em agitação lenta por 30 minutos, a fim de ocorrer a ligação entre o peptídeo ligado à PMs com a anti-*M. leprae*. Logo após, passando por 3 lavagens com TF-Tween 20 0,05% (v/v), utilizando a separação magnética para a eliminação de interferentes da amostra de soro. Foi então adicionado 20 µL da AgNP marcada com anti-IgG humano e agitado por 1 hora, para que ele se ligue ao anti-*M. leprae* formando uma estrutura tipo sanduíche, que está representado na FIGURA 3.4. Posteriormente após 3 lavagens para eliminar os anticorpos marcados que não reagiram ressuspendeu-se o bioconjugado formado em 700 µL em TF 0,01 mol/L pH 7,4. As etapas que ocorrem para a formação do bioconjugado final estão na FIGURA 3.5.

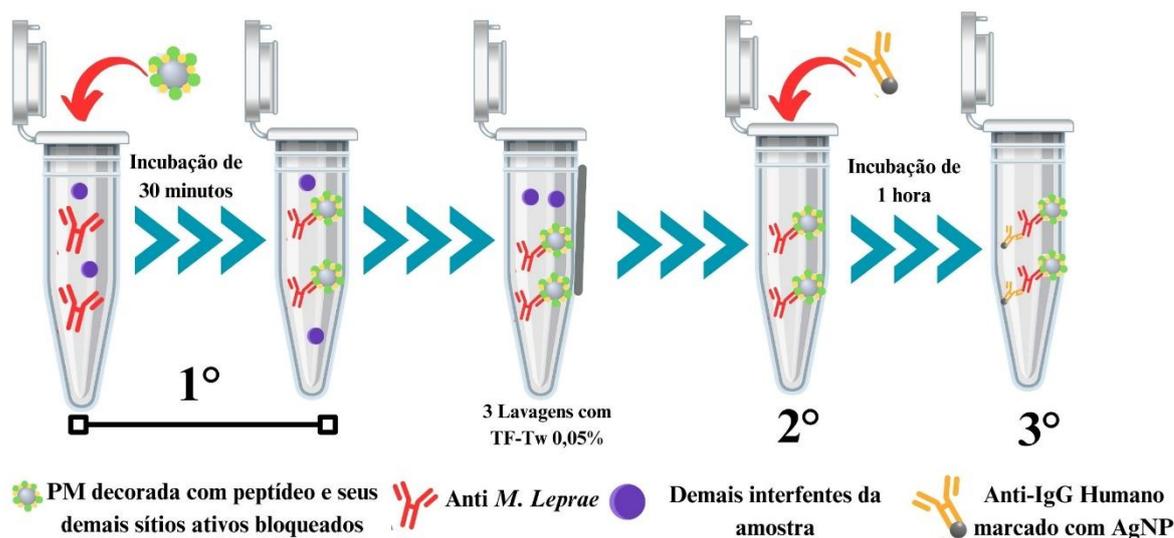


FIGURA 3.4 – Etapas de captura e separação magnética do anti-*M. leprae* da amostra de soro e da adição do anti-IgG-AgNP para formação do bioconjugado que irá permitir a detecção eletroquímica do alvo.

Fonte: A autora.

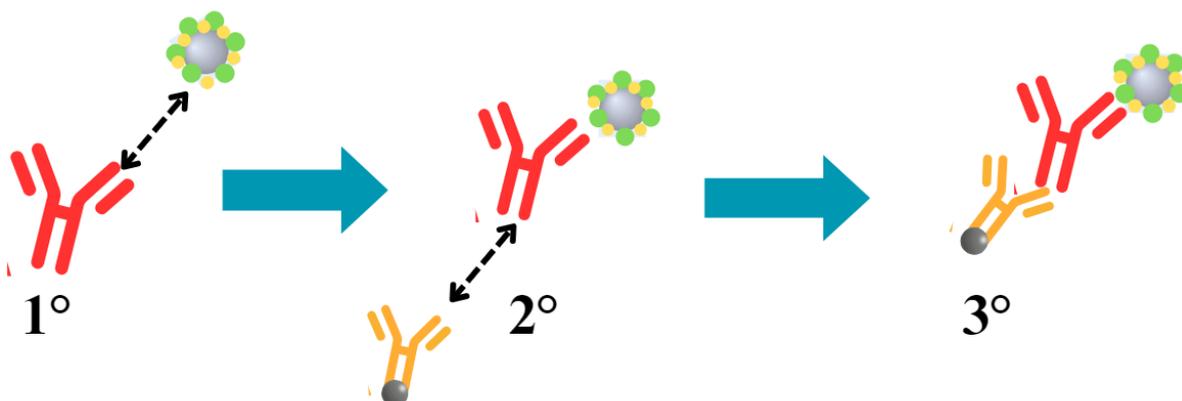


FIGURA 3.5 - Representação das etapas para a formação do bioconjugado, onde em 1º: ligação entre PM modificada com peptídeo sintético e o anticorpo anti-*M. leprae*; 2º: ligação entre o bioconjugado anti-*M. leprae*/PM e o Ab/AgNP; 3º complexo final.

Fonte: A autora.

Na FIGURA 3.6 está representado como o bioconjugado sanduíche fica no eletrodo de trabalho. Nele as PMs modificadas com o peptídeo sintético são atraídas pelo ímã, arrastando o anticorpo alvo e consigo o anticorpo secundário ligado a nanopartícula de prata. Ao aplicar o potencial é possível obter o sinal eletroquímico da prata.

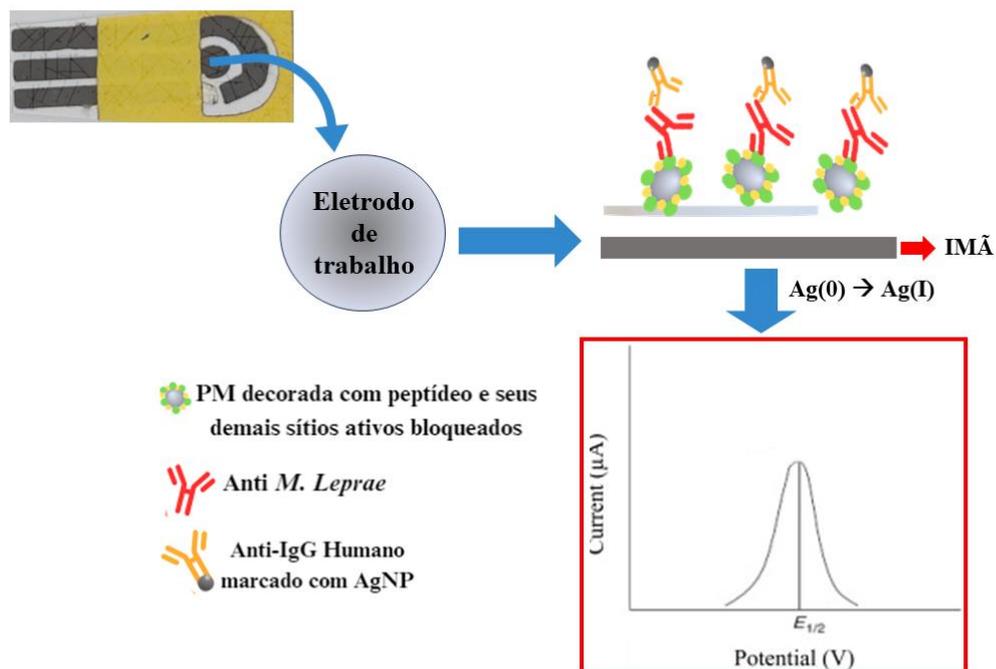


FIGURA 3.6 - Esquematização do sistema utilizado para a detecção do anti-*M. leprae* no sanduíche utilizando SPEs e imãs.

FONTE: Adaptado de Hao et al..

3.14 Modificação dos eletrodos de trabalho com as AgNPs

Eletrodos modificados foram utilizados em apenas uma etapa da avaliação das otimizações dos parâmetros experimentais, sendo essa, na avaliação de diferentes eletrólitos a serem utilizados, contidos no item 4.3.2.

Para a modificação utilizou-se 5 μL da dispersão das AgNPs em cada eletrodo de trabalho do arranjo de 8 células. Foi deixado em repouso por 24 horas na ausência de luz, e retirado com uma micropipeta, o excesso de dispersão que não secou.

3.15 Planejamento Fatorial 2^4 com ponto central

Com a utilização de um planejamento fatorial 2^4 com ponto central foi encontrado as melhores condições experimentais para as variáveis avaliadas. Nesse planejamento, como observado na TABELA 3.5 avaliou-se quatro variáveis, sendo ela concentração de partícula magnética sem modificação (v1), concentração de peptídeo sintético (v2), sendo as variáveis 1 e 2 utilizadas na

etapa de modificação das PMs com os peptídeos. As outras duas variáveis avaliadas foram os dois tempos necessários para formar o imunocomplexo, sendo o tempo de captura (v3) necessário para que ocorra a captura do anticorpo anti-*M. leprae* no bioconjugado PM/Pep. E por último, o tempo de incubação (v4), necessário para que ocorra a ligação entre o anticorpo alvo com a AgNP/Ab₂, formando o biocomplexo final.

TABELA 3.5 – Parâmetros experimentais do imunoenensaio proposto referentes utilizados no planejamento e os respectivos níveis codificados.

Parametros	Variáveis	-1	0	+1
C _{PM} (µg mL ⁻¹)	v1	5,70	11,40	17,10
C _{pep} (µg mL ⁻¹)	v2	10	20	30
Tempo de captura (min)	v3	10	20	30
Tempo de incubação (min)	v4	10	20	30

As variáveis foram codificadas em -1 e +1, sendo realizados experimentos de 1 a 20, de forma que do experimento 17 ao 20 são réplicas realizadas no ponto central. Os experimentos com a suas variáveis codificadas estão contidas na TABELA 3.6.

TABELA 3.6 – Resultados experimentais do planejamento para as variáveis 1 (CPM), 2 (Cpep), 3 (tempo de captura) e 4 (Tempo de incubação).

Exp.	v1	v2	v3	v4
1	-1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1	-1
3	-1	+1	-1	-1
4	+1	+1	-1	-1
5	-1	-1	+1	-1
6	+1	-1	+1	-1
7	-1	+1	+1	-1
8	+1	+1	+1	-1

9	-1	-1	-1	+1
10	+1	-1	-1	+1
11	-1	+1	-1	+1
12	+1	+1	-1	+1
13	-1	-1	+1	+1
14	+1	-1	+1	+1
15	-1	+1	+1	+1
16	+1	+1	+1	+1
17	0	0	0	0
18	0	0	0	0
19	0	0	0	0
20	0	0	0	0

Para cada experimento foram avaliadas duas amostras, sendo o branco e uma amostra MB na diluição 1:50. As variáveis independentes foram as respostas normalizadas de valores de ΔF (%), sendo calculado utilizando a Eq. 3.1. Mantiveram-se fixas as condições do bioconjugado AgNP/Ab₂ (1 mL da dispersão das AgNPs e 1 $\mu\text{g/mL}$ de anti-IgG humano) e para a modificação das PMs (etanolamina 1 mmol/L e EDC/NHS 0,1 mol/L).

$$\Delta F (\%) = \frac{(I_{\text{amostra}} - I_{\text{branco}})}{I_{\text{branco}}} \times 100 \quad \text{Eq. 3.1}$$

Realizado o planejamento fatorial 2^4 com ponto central, pode-se obter uma equação geral como representado na Eq. 3.2. Posteriormente adquirido a equação que represente o modelo, pode-se construir os gráficos de contorno, utilizando um *template* fornecido por Pereira e Pereira-Filho¹⁰⁵ no Excel, de forma que se verificou as regiões de resposta máxima.

$$\Delta F (\%) = b_1v_1 + b_2v_2 + b_4v_4 + b_{12}v_1v_2 + b_{14}v_1v_4 + b_{24}v_2v_4 \quad \text{Eq. 3.2}$$

3.16 Avaliação da reprodutibilidade e repetibilidade do magneto-imunoensaio

Para avaliar a repetibilidade do imunoensaio foram analisados 5 imunoensaios da mesma amostra utilizada em todas as avaliações dos parâmetros com as melhores condições encontradas. Os imunoensaios foram realizados no mesmo dia e, já a precisão intermediária foi realizada analisando 5 imunoensaios preparados em dias diferentes. Para a avaliação, foi utilizado o desvio padrão relativo (DPR (%)) das réplicas, contido na Eq 3.3, sendo DP o desvio padrão e \bar{X} a média.

$$DPR (\%) = \frac{DP}{\bar{X}} * 100 \quad \text{Eq 3.3}$$

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Reação de formação das nanopartículas de prata

A reação que ocorre entre o AgNO_3 e o NaBH_4 é uma oxirredução, na qual o nitrato de prata tem a função de oxidante enquanto o borohidreto de sódio age como redutor e estabilizador. O NaBH_4 auxilia evitando a agregação das partículas, por meio dos íons BH_4^- irão ser adsorvidos na superfície das AgNPs, gerando repulsão eletrostática, como esquematizado na FIGURA 4.1. Assim, ele deve estar em leve excesso na reação, como mostra a EQUAÇÃO 4.1, porém caso esteja em quantidades muito acima do necessário, pode ser promovido o efeito inverso, no qual o excesso de íons BH_4^- causam a agregação das partículas¹⁰⁶. Além disso, é importante destacar que o NaBH_4 é um agente redutor forte sendo necessário o resfriamento do meio reacional e a adição gota a gota do AgNO_3 ⁷³.

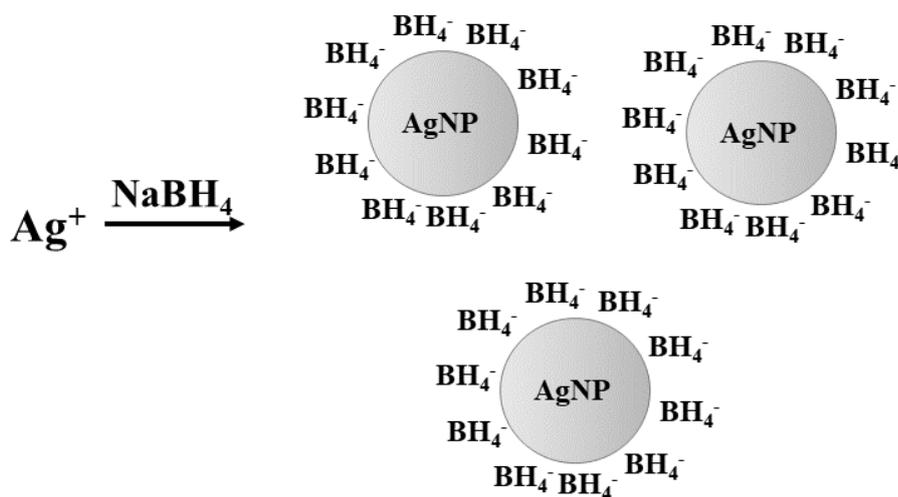
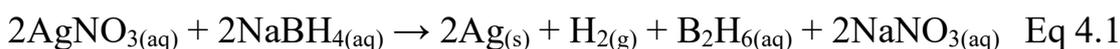


FIGURA 4.1 – Representação esquemáticas da formação das AgNPs e dos íons borohidreto adsorvidos na superfície das AgNPs

Fonte: Adaptado de Durán et al.¹⁰⁷.

4.1.1 Caracterização por espectrofotometria na região do UV-vis

Por meio da caracterização por espectrofotometria na região do UV-vis, foi possível verificar o perfil de absorção da dispersão de AgNPs, sendo que o pico máximo de absorbância foi obtido em 390 nm, como observado na FIGURA 4.2. O pico de absorção obtido próximo a 400 nm é característico das AgNPs, confirmando, portanto, a efetividade da síntese realizada¹⁰⁸.

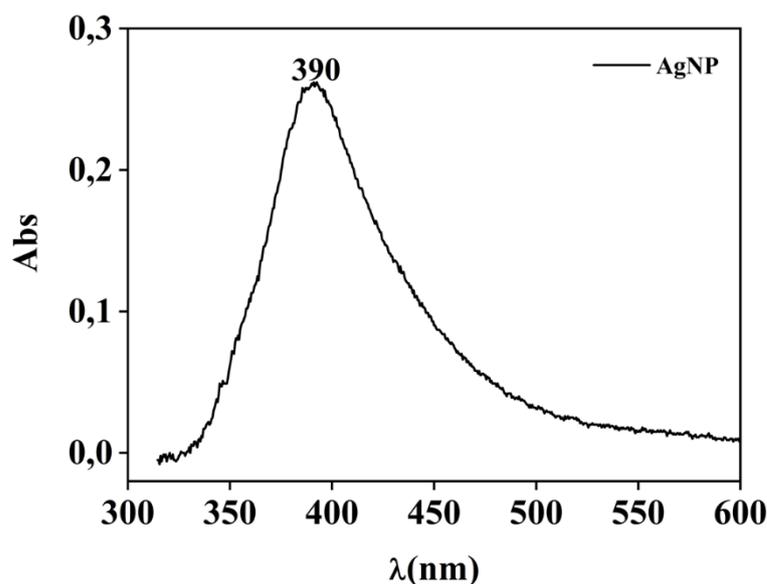


FIGURA 4.2 - Espectro de absorção da dispersão das AgNPs sintetizadas.

Fonte: A autora.

Outra característica das AgNPs é a sua coloração da dispersão, sendo a cor amarela característica para a presença destas nanopartículas. Tal cor é resultado da absorção da radiação eletromagnética em ressonância com os plasmons de superfície conforme descrito na Introdução. Assim, com o aumento do diâmetro das partículas de prata, a cor amarela passa para a laranja e posteriormente, para o violeta, até atingir a coloração característica da prata macroscópica⁷³. A FIGURA 4.3 apresenta a dispersão das AgNPs obtida ao final do processo de síntese.



FIGURA 4.3 - Dispersão de AgNPs obtidas via síntese com NaBH_4 e a sua coloração característica.

Fonte: A autora.

4.1.2 Caracterização das AgNPs por Microscopia Eletrônica de Transmissão e por Espectroscopia por Energia Dispersiva

Por meio da análise de Microscopia Eletrônica de Transmissão foi possível avaliar a morfologia e tamanho das AgNPs obtidas. Na FIGURA 4.4A é possível observar que as nanopartículas possuem estruturas em formato esférico. Avaliando os tamanhos das partículas obtidos foi possível construir o histograma apresentado na FIGURA 4.4B. Nele é observado que a maioria das nanopartículas tem tamanhos entre 15 e 20 nm, sendo a média de $18,0 \pm 5,5$ nm de diâmetro. Esse resultado é semelhante com a literatura para a reação de síntese utilizada para a formação das AgNPs⁸⁸.

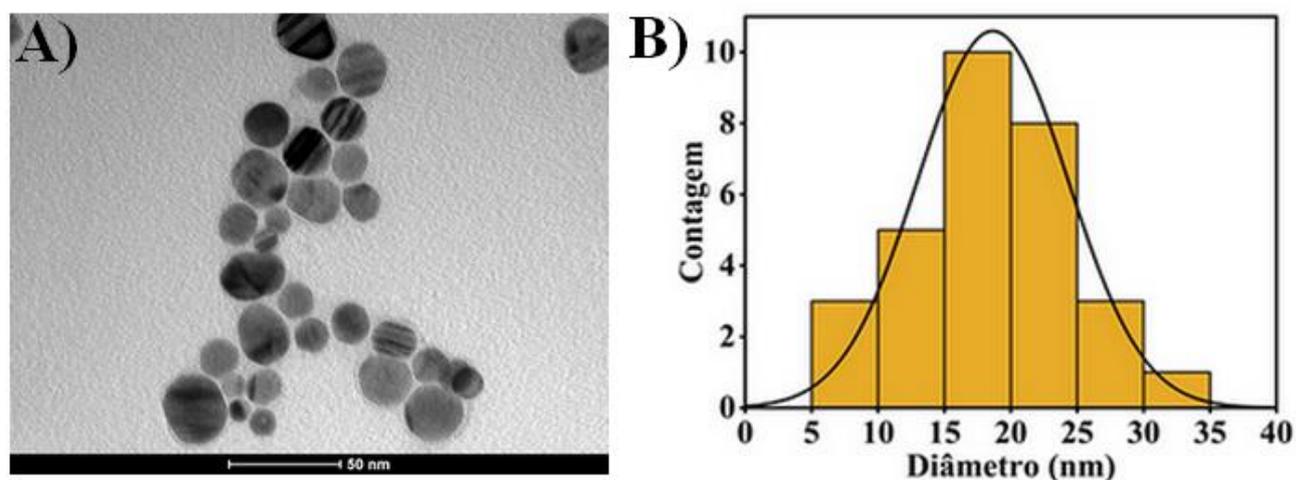


FIGURA 4.4 - Caracterização por MET das AgNPs sintetizadas. A) Imagem das partículas; B) Histograma com os valores de diâmetros calculados.

Fonte: A autora.

Uma análise de Espectroscopia por Energia Dispersiva (EDS), acoplado ao microscópio eletrônico de transmissão, permitiu confirmar a composição das AgNPs. A partir da FIGURA 4.5 é possível observar que foi detectado os elementos prata e cobre, de forma que a prata advém das nanopartículas, enquanto que o cobre é originário do grid utilizado como suporte para o filme de carbono amorfo, onde foi depositado as AgNPs. Isso indica que esses dois elementos estão em quantidades detectáveis, podendo haver outros elementos, mas em concentrações mais baixas do que o limite de detecção do equipamento.

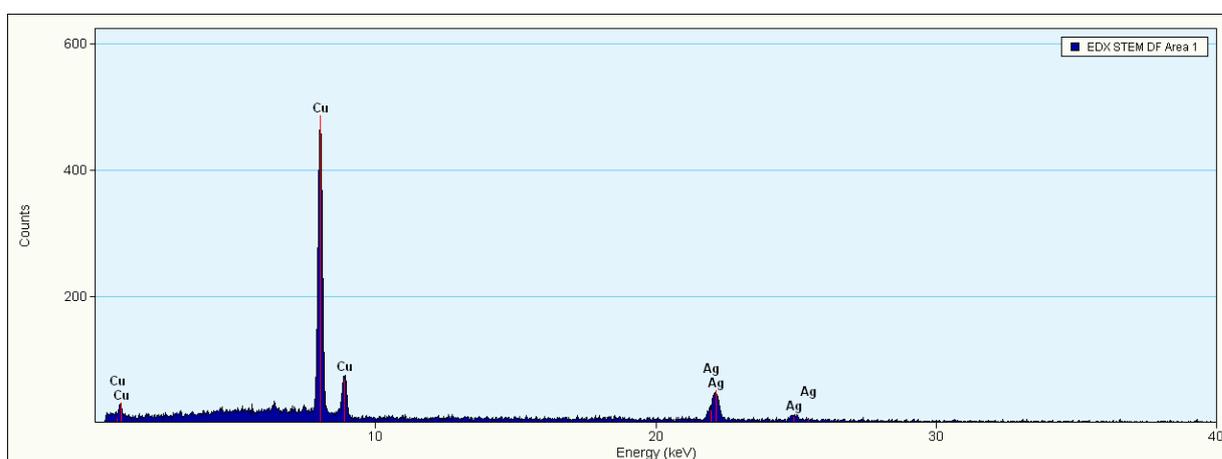


FIGURA 4.5 – Caracterização das AgNPs por EDS.

Fonte: A autora.

4.2 Caracterização da formação do conjugado Ab₂-AgNP

Antes de qualquer otimização do método proposto, foi necessário avaliar a ligação entre o anticorpo anti-IgG humano (ab₂) e as AgNPs. Para isso se realizou a medida do espectro de UV-visível tanto das AgNPs puras quanto do bioconjugado Ab₂-AgNP, FIGURA 4.6. Para ambos os espectros, foram obtidas bandas de absorbância máxima em 390 nm e 398 nm. Como afirmado no capítulo anterior, é característica para AgNPs máximos de absorção próximos a 400 nm. A confirmação da ocorrência da ligação entre o anticorpo e a nanopartícula se deu por meio da diminuição da absorbância para a dispersão contendo o bioconjugado. Essa diminuição, como apontado por Wu *et al.* é um indicativo da conjugação. Esse resultado mostra que os sítios ativos presentes na superfície da nanopartícula marcada com glutationa, foram preenchidas pelas moléculas do anticorpo, ocorrendo imobilização do mesmo¹⁰⁸.

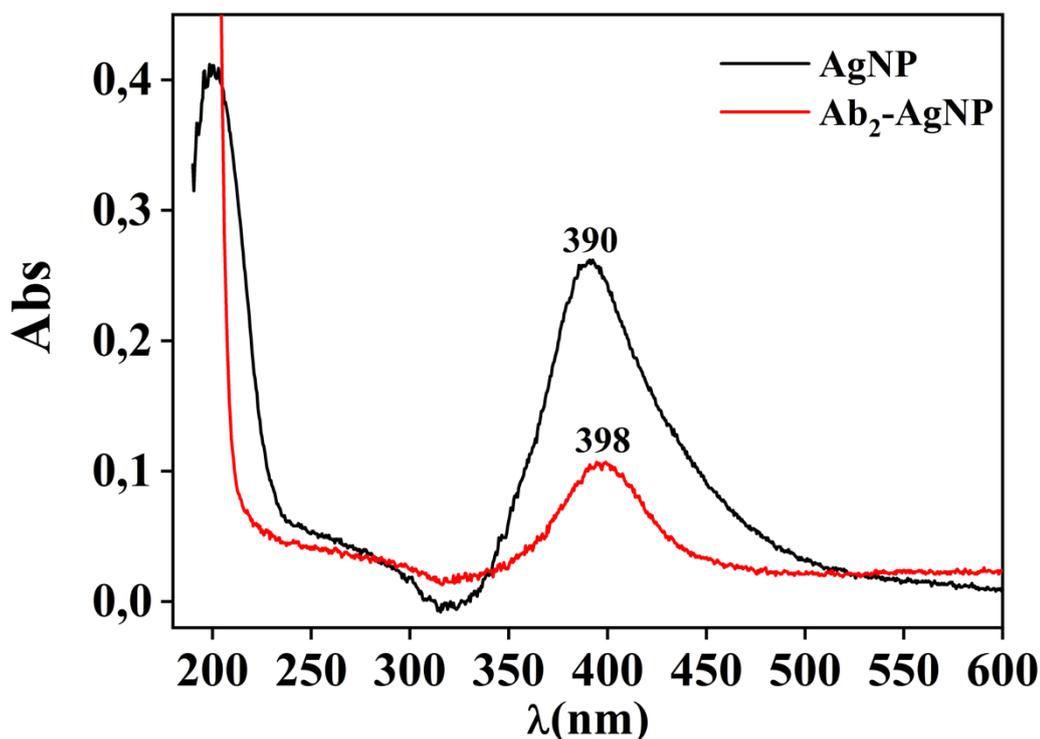


FIGURA 4.6 - Espectro UV-vis das dispersões de AgNPs e Ab₂-AgNP.

Fonte: A autora.

4.3 Avaliação dos parâmetros experimentais referentes ao imunoensaio proposto

Neste item, serão apresentados alguns estudos de parâmetros referentes as diferentes etapas necessárias para a aplicação do magneto-imunoensaio proposto. Em todos os experimentos realizados para a avaliação dos parâmetros, com exceção da etapa de avaliação do eletrólito utilizado, foi realizado o magneto-imunoensaio. Primeiramente foi modificada a partícula magnética com o peptídeo sintético, como descrito no item 3.10. Em outro microtubo, foi marcado a AgNP com o anticorpo secundário, estando descrito no item 3.8. Para a última etapa, onde se formou o bioconjugado final, seguiu-se o procedimento descrito no item 3.13, capturando o anticorpo alvo anti-*M. leprae*. Nesta etapa utilizou-se uma amostra de um paciente já diagnosticado com a hanseníase MB, na diluição de 1:50. Em um microtubo, a alíquota da amostra foi incubada primeiro com a PM modificada, para que o alvo fosse capturado pela PM modificada, e após as lavagens, foi novamente incubada com a nanopartícula marcada com o anticorpo secundário. Ao final, em cada eletrodo de trabalho do arranjo de 8 células, foi adicionado 40 µL do material já ressuspensionado em TF 0,01 mol/L em pH 7,4.

A técnica DPV foi utilizada na etapa de detecção no qual as AgNPs atuam como marcador eletroquímico. Como referência dos parâmetros para DPV utilizou-se o trabalho de Beck *et al.*. Foi realizado um pré-tratamento com o intuito de concentrar o bioconjugado com a nanopartícula no eletrodo de trabalho. Foi aplicado um potencial de 1,25 V por 60 segundos a fim de promover a oxidação da prata presente nas AgNPs, seguida da aplicação um potencial de -0,8 V por 30 segundos que promoveu a redução de prata que previamente oxidada. Após estas etapas foi realizada a DPV iniciando em -0,25 V e finalizando em 0,3 V de forma a promover a oxidação da prata com formação de um pico anódico¹⁰⁹. O perfil voltamétrico para as AgNPs utilizando o método acima está na FIGURA 4.7.

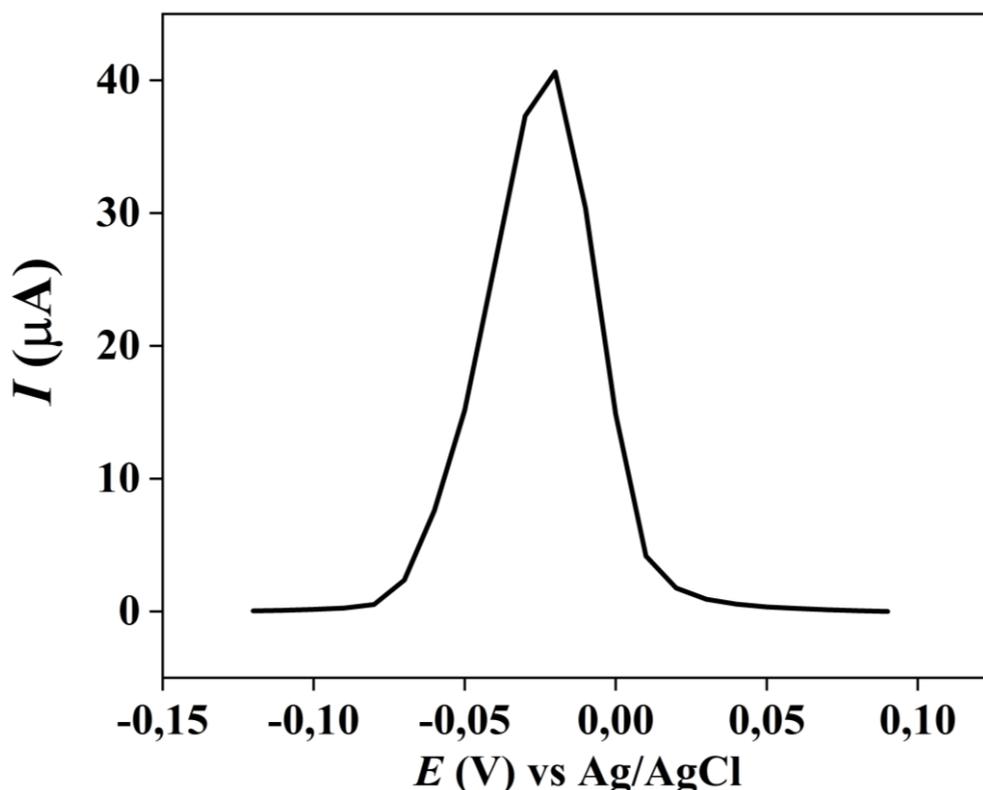


FIGURA 4.7 - Voltamograma obtido por DPV para eletrodo modificado com AgNP em TF 0,1 mol/L e pH 7,4.

FONTE: A autora.

4.3.1 Avaliação diluição da amostra de soro positiva

Uma vez que não possuímos o anticorpo anti-*M. leprae* utilizamos amostras de paciente positivo para hanseníase MB como referência para os estudos. Desta forma realizamos um estudo prévio, com o intuito de verificar qual a melhor diluição da amostra. Isso decorre do fato que ainda não é possível obter comercialmente padrões para esta doença. Sendo assim, trabalhou-se com amostras de soro em diferentes diluições, sendo avaliado qual obteria uma maior resposta de corrente e seria, portanto, utilizada nos estudos posteriores. Como observado na FIGURA 4.8, a diluição escolhida para ser utilizada no restante do trabalho foi a de 1:50, pois além de apresentar maior resposta de corrente de pico, também apresentou uma boa diferenciação entre a resposta do branco e a da amostra.

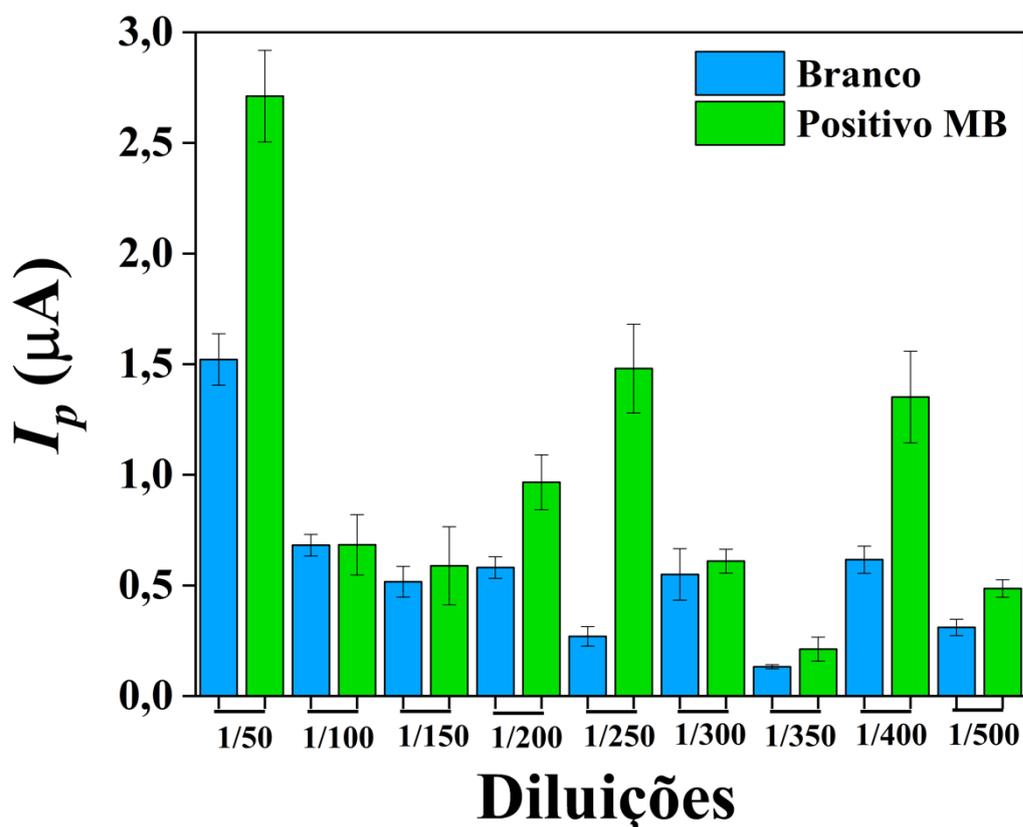


FIGURA 4.8 – Avaliação da diluição da amostra de soro de paciente positivo hanseníase MB e do branco utilizando o imunoenensaio proposto.

Fonte: A autora.

4.3.2 Avaliação do uso de diferentes eletrólitos e suas respostas de corrente

Neste trabalho, foram avaliados seis eletrólitos de suporte diferentes, sendo o cloreto de sódio, o ácido clorídrico, o cloreto de potássio, o ácido nítrico, o tampão fosfato salino (PBS) pH 7,4 e o TF pH 7,4, todos na concentração de 0,1 mol/L. Nesta etapa não foi utilizado o biocomplexo sanduiche como no restante do trabalho, mas sim eletrodos modificados com as AgNPs, gotejando 5 µL da dispersão sobre cada de eletrodo de trabalho. Para as medidas eletroquímicas, foi adicionado 40 µL do eletrólito a ser avaliado e iniciado a medida eletroquímica. Como observado na FIGURA 4.9B, as respostas obtidas mostram que o maior valor de corrente obtido foi com PBS, porém o desvio-padrão para esse eletrólito também foi o mais elevado. A segunda maior resposta

foi obtida com uso do TF, que apresentou um desvio-padrão menor e por esse motivo foi o eletrólito escolhido para dar continuidade no projeto. A resposta obtida para o HNO₃ foi a que apresentou menores valores de corrente de pico e perfil diferente dos outros eletrólitos estudados. Nos demais eletrólitos, havia a presença de ânions que reagem com a prata, seja levando a formação de precipitados ou íons complexos. Já a prata em ácido nítrico havia a presença somente de NO₃⁻. Como há a presença dos contra-íons cloreto (Cl⁻) e fosfato (PO₄³⁻), a prata irá reagir levando a formação de precipitados como cloreto de prata (AgCl) e fosfato de prata (Ag₃PO₄)¹¹⁰, mesmo que o íon fosfato esteja em baixa concentração, devido ao pH do meio. Desta forma com todos os eletrólitos utilizados observa-se um deslocamento dos picos para valores de potenciais mais negativos, com exceção do HNO₃ conforme se observa na FIGURA 4.9A. Os valores de constante de solubilidade para o AgCl e Ag₃PO₄ são respectivamente $1,82 \times 10^{-10}$ e $2,8 \times 10^{-18}$ a 25°C, enquanto que para o complexo [AgCl₂]⁻ o valor de constante de complexação é de $1,7 \times 10^5$ ¹¹¹.

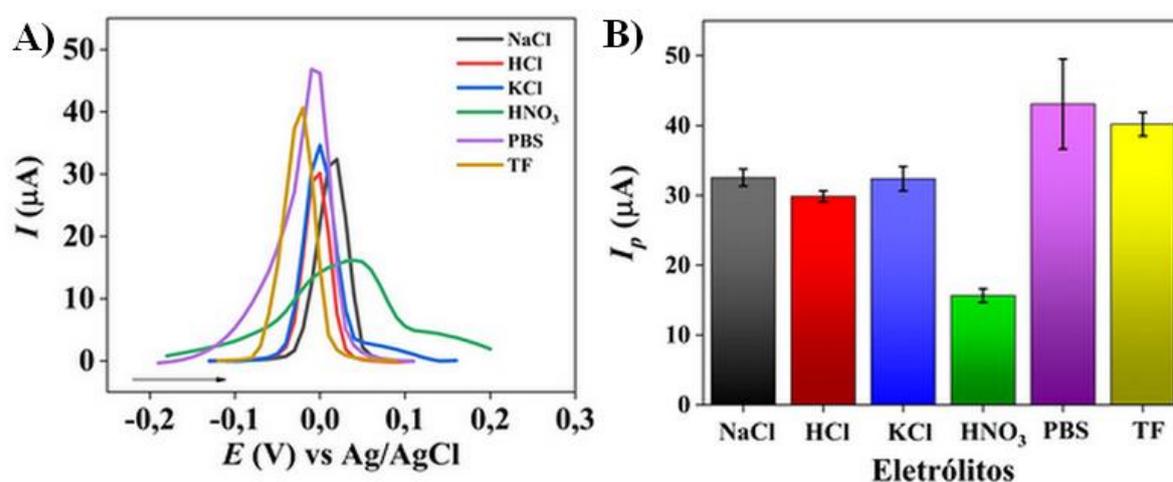


FIGURA 4.9 - Avaliação da resposta eletroquímica das AgNPs utilizando diferentes eletrólitos de suporte com concentração de 0,1 mol/L. A) Voltamogramas obtidos com os diferentes eletrólitos de suporte; B) Média das correntes de pico obtidas com cada eletrólito de suporte. n=4

Fonte: A autora.

4.3.3 Avaliação da influência da quantidade Ab₂-AgNP

Com o objetivo de otimizar o imunoenensaio, avaliou-se a influência da quantidade de bioconjugado Ab₂-AgNP na resposta eletroquímica do método. Para isto, foram adicionados diferentes volumes da dispersão do bioconjugado Ab₂-AgNP que foi previamente preparado, sendo esses de 10, 20, 30 e 50 μL . Na FIGURA 4.10 são apresentados os resultados obtidos neste estudo, e é possível observar que o volume de 20 μL foi o que apresentou melhor resposta de corrente para a amostra de paciente positivo MB, além de também apresentar maior diferenciação entre a resposta do branco e a da amostra, sendo, portanto, o volume escolhido para dar continuidade aos estudos.

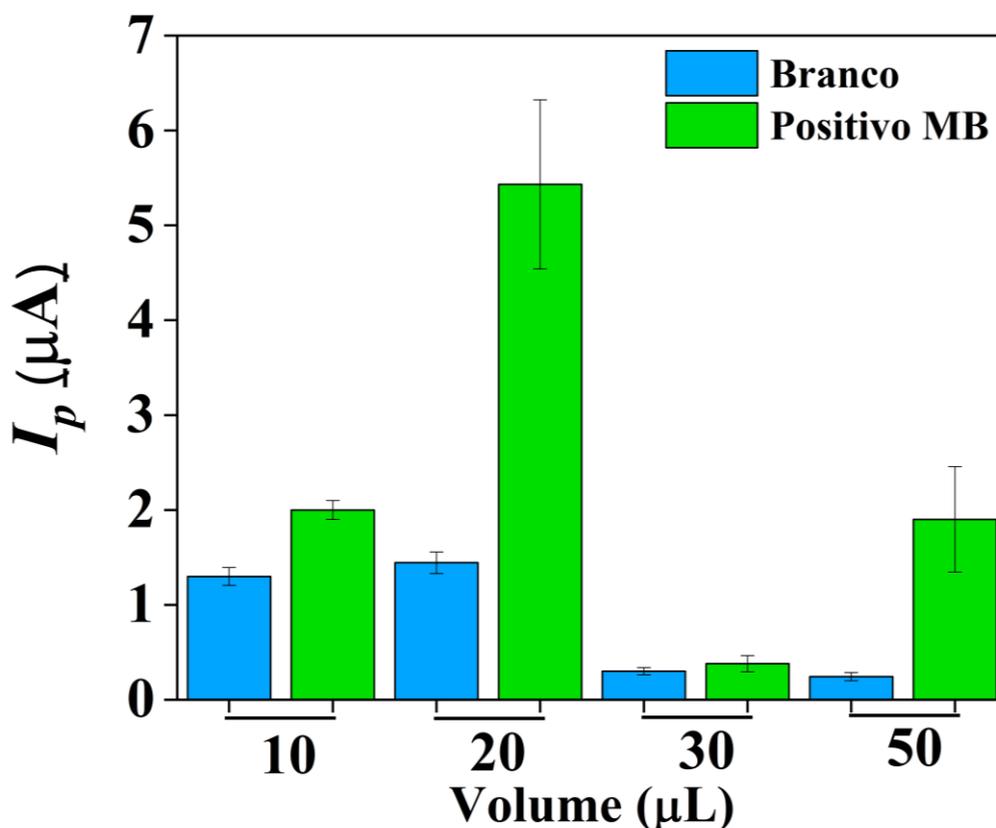


FIGURA 4.10 - Avaliação do volume de conjugado Ab₂-AgNP utilizado no imunoenensaio. A) DPV para o volume de 20 μL de Ab₂-AgNP do branco e amostra positiva; B) Média dos valores de corrente anódica obtidas para os diferentes volumes de AgNP utilizados e diferentes amostras. n=4

Fonte: A autora.

4.3.4 Avaliação da resposta eletroquímica variando a forma de utilização dos ímãs

Outra otimização do método envolveu a forma como os ímãs de Neodímio são posicionados externamente sob os eletrodos de trabalho. Como descrito anteriormente, a utilização das PMs garante a captura e separação do biomarcador da matriz da amostra eliminando a influência possíveis interferentes. Além disso, as PMs permitem que ocorra a pré-concentração do analito na superfície do eletrodo de trabalho com a utilização de ímãs que são posicionados atrás dos eletrodos de trabalho. Sendo assim, foi avaliado duas formas diferentes de se utilizar os ímãs nos eletrodos de trabalho: i) utilizando um suporte com os ímãs encaixados de forma fixa, onde esse suporte foi encaixado diretamente no terminal de contato elétrico do potenciostato, como observado na FIGURA 4.11A, podendo ser colocado o arranjo de eletrodos de forma que os ímãs ficassem posicionados logo abaixo dos eletrodos de trabalho, como pode ser observado na FIGURA 4.11B. ii) A outra forma foi colar os ímãs manualmente, com o auxílio de uma fita adesiva dupla face, no verso do arranjo, de forma que ficassem posicionados exatamente atrás de cada eletrodo de trabalho. O arranjo de eletrodos com as diferentes formas de posicionar os ímãs estão representados na FIGURA 4.11. Outro detalhe importante foi que os ímãs tinham formato cilíndrico, tendo o mesmo diâmetro dos eletrodos de trabalho (3mm).



FIGURA 4.11 - Representação do uso da base de imãs. A) Base de imãs acoplada no contato do potenciostato; B) Dispositivo eletroquímico encaixado no contato em cima dos imãs.

Fonte: A autora.

Os resultados obtidos nesse estudo indicam que os imãs posicionados de forma manual apresentaram respostas com valores de corrente mais elevadas, além de uma maior diferenciação entre os resultados de correntes obtidos para o branco e para a amostra de paciente positivo MB, do que aquelas obtidas utilizando o suporte com os imãs fixos (FIGURA 4.12). Isso se deve principalmente, por conta de, ao se utilizar o suporte com imãs, os eletrodos de trabalho não ficavam tão próximos dos imãs como seria necessário e podem mesmo ficar ligeiramente desalinhados. Sendo assim, optou-se por utilizar a forma dos imãs colados manualmente, como forma de se obter respostas de correntes maiores. Uma solução para este problema seria desenvolver um suporte com características que permitam fixar o arranjo de eletrodos de forma mais efetiva e que está previsto de ser desenvolvido como trabalho futuro.

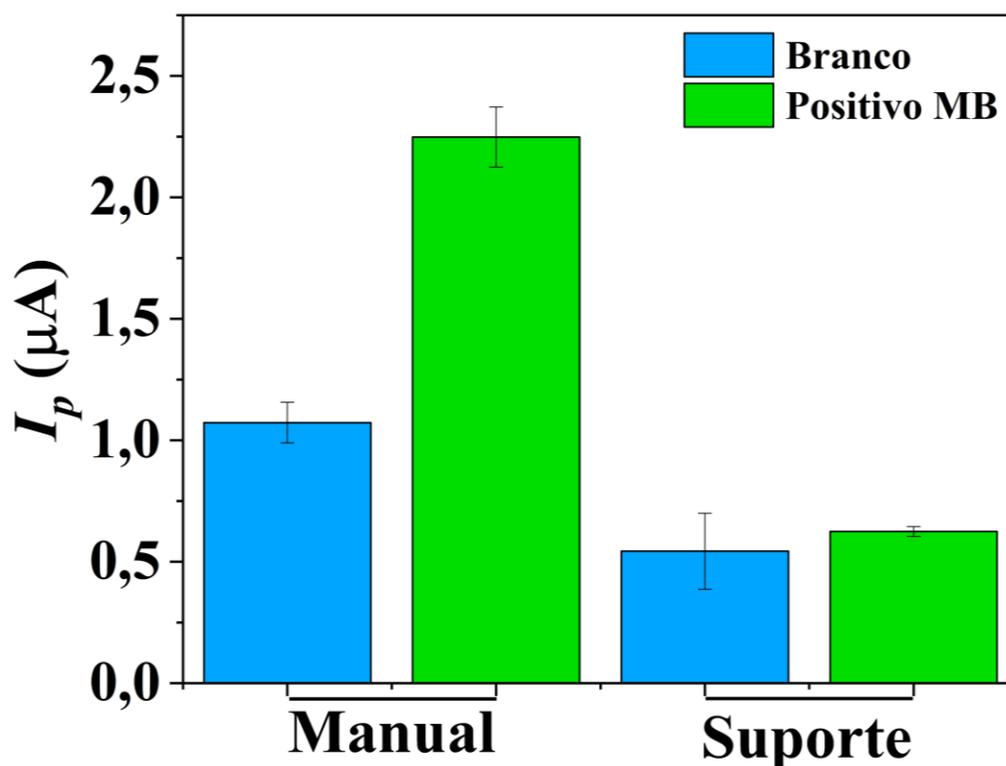


FIGURA 4.12 - Avaliação da resposta do ensaio imuno-magnético aplicados em amostra do branco e do soro de paciente positivo MB utilizando os imãs fixados manualmente sobre os eletrodos de trabalho e com o uso do suporte com os imãs fixados.

Fonte: A autora.

4.3.5 Avaliação da resposta eletroquímica variando dois operadores

Por fim, avaliou-se a viabilidade do método desenvolvido frente a execução por mais de um analista. O intuito foi verificar se haveria grande diferenças entre as respostas obtidas pelos diferentes operadores. A FIGURA 4.9C mostra que não houve diferenças significativas nos resultados de corrente obtidos para ao aplicar o método em uma mesma amostra de soro de paciente positivo MB. Na FIGURAS 4.9A e 4.9B, é possível observar que os perfis voltamétricos obtidos são semelhantes. Aplicando o teste t para os resultados de resposta de corrente, foi obtido um valor de 0,053 que é menor do que valor tabelado de 2,78 portanto, constata-se que não há diferença significativa entre os resultados obtidos pelos diferentes operadores.

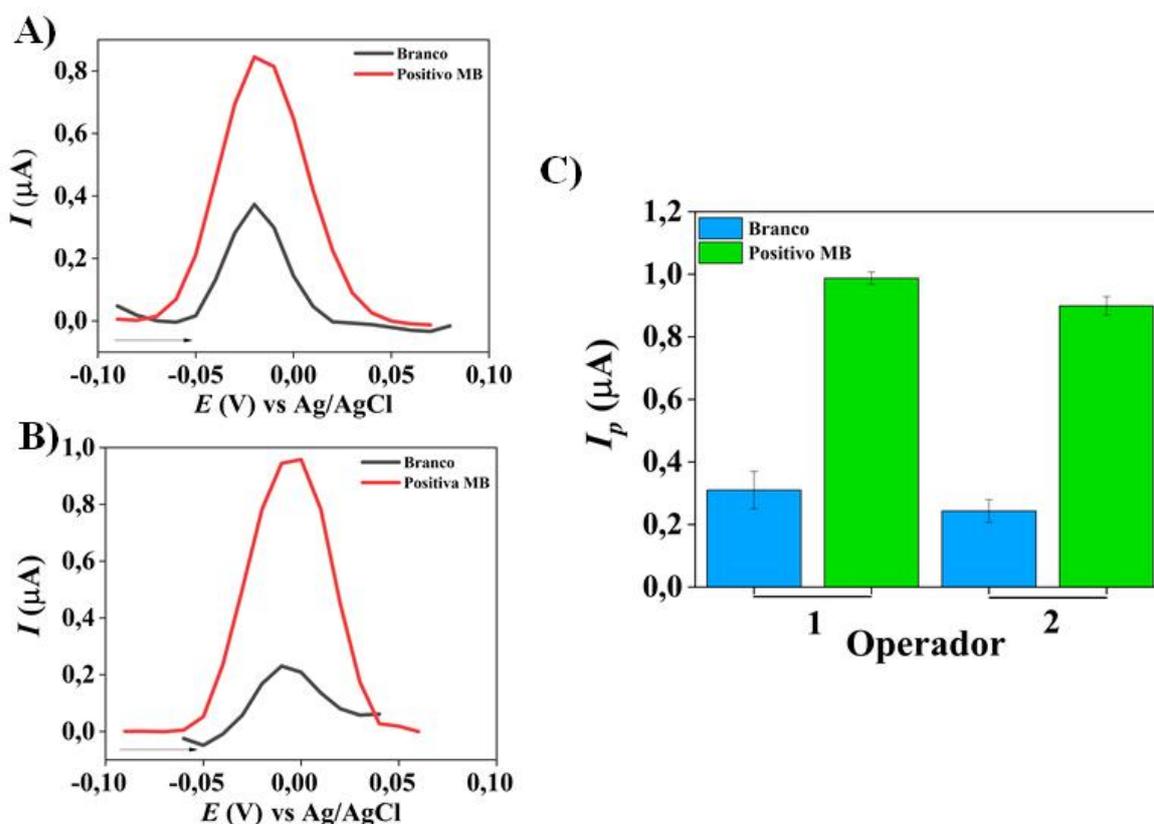


FIGURA 4.13 - Avaliação da aplicação do método por diferentes analistas. Voltamogramas obtidos para o branco e amostra de soro de paciente positivo MB com A) para o operador 1 e B) operador 2. C) Gráfico de barras com as respostas de correntes obtidas por cada analista. $n=4$

Fonte: A autora.

4.4 Avaliação dos principais parâmetros do imunoensaio proposto utilizando planejamento fatorial 2^4 com ponto central

Um planejamento fatorial 2^4 com ponto central foi executado a fim de avaliar os principais parâmetros experimentais com o intuito de se obter as melhores condições experimentais. Buscou-se a maior resposta eletroquímica como aquela capaz de melhor diferenciar as respostas de branco de uma amostra de soro de paciente diagnosticado com hanseníase MB. Assim, foi organizado inicialmente com um planejamento fatorial 2^4 (experimentos de 1 a 16) com as variáveis codificadas entre -1 e $+1$ sendo que os experimentos de 17 a 20 representam as quatro réplicas do ponto central (variáveis codificadas em 0). A variável independente foi as respostas normalizadas entre o branco e a amostra (ΔF (%)). As variáveis dependentes em seus respectivos níveis de variação e as respostas obtidas estão descritos na TABELA 4.1.

TABELA 4.1 – Resultados experimentais do planejamento para as variáveis 1 (CPM), 2 (C_{pep}), 3 (tempo de captura) e 4 (Tempo de incubação); e as respostas normalizadas entre o branco a amostra (ΔF (%)).

Exp.	v1	v2	v3	v4	ΔF (%)
1	-1	-1	-1	-1	471,14
2	+1	-1	-1	-1	143,95
3	-1	+1	-1	-1	267,80
4	+1	+1	-1	-1	196,96
5	-1	-1	+1	-1	121,07
6	+1	-1	+1	-1	461,52
7	-1	+1	+1	-1	233,73
8	+1	+1	+1	-1	128,91
9	-1	-1	-1	+1	1.894,13
10	+1	-1	-1	+1	544,90
11	-1	+1	-1	+1	206,53

12	+1	+1	-1	+1	193,99
13	-1	-1	+1	+1	1.305,20
14	+1	-1	+1	+1	81,92
15	-1	+1	+1	+1	410,66
16	+1	+1	+1	+1	359,82
17	0	0	0	0	1.479,66
18	0	0	0	0	1.995,00
19	0	0	0	0	1.416,03
20	0	0	0	0	1.628,88

Inicialmente, foi elaborada uma matriz principal com os efeitos de 1 a 15 e a resposta, sendo: efeito 1 (v1), efeito 2 (v2), efeito 3 (v3), efeito 4 (v4), efeito 5 (interação v1 e v2), efeito 6 (v1 e v3), efeito 7 (v1 e v4), efeito 8 (v2 e v3), efeito 9 (v2 e v4), efeito 10 (v3 e v4), efeito 11 (v1, v2 e v3), efeito 12 (v1, v2 e v4), efeito 13 (v1, v3 e v4), efeito 14 (v2, v3 e v4) e efeito 15 (interação entre todas variáveis). Assim, o modelo foi avaliado empregando a rotina “fabi_efeito” para determinar quais efeitos são mais importantes para obter os melhores resultados. Para isso, foi calculado a variância experimental (21.898,64), erro experimental (147,98) e o erro de um efeito (36,99) por meio dos resultados obtidos nas réplicas do ponto central. Na FIGURA 4.14A é apresentado o gráfico de porcentagem que cada efeito impacta na resposta enquanto na FIGURA 4.14B são apresentados os efeitos significativos em um intervalo de confiança de 95% e $t = 3,18$ para grau de liberdade igual a 3 uma vez que havia 4 réplicas no ponto central.

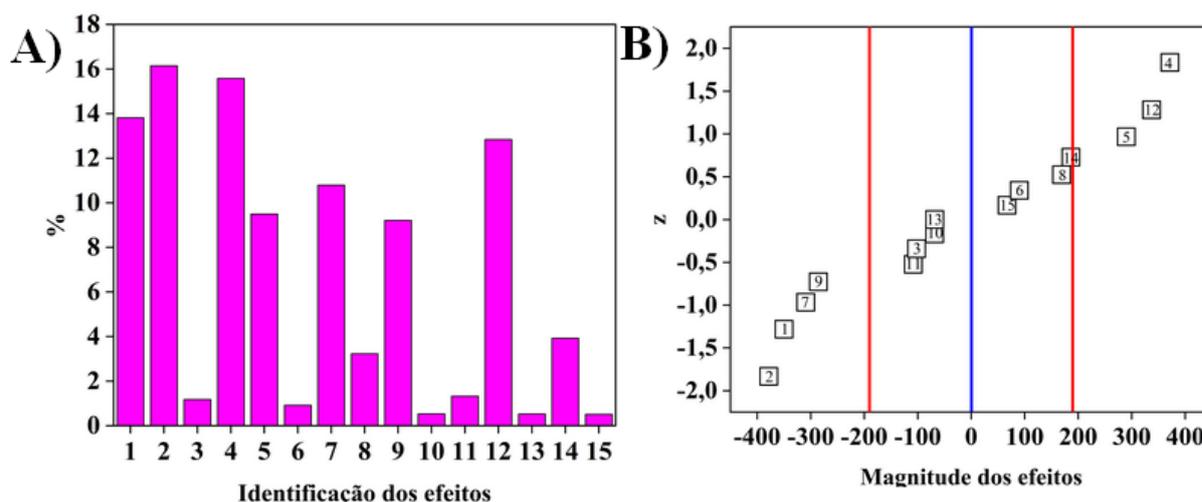


FIGURA 4.14 - Significância dos efeitos referentes as variáveis 1 (C_{PM}), 2 (C_{Pep}), 3 (Tempo de captura) e 4 (Tempo de incubação).

Fonte: A autora.

Como pode ser observado na FIGURA 4.14A, os efeitos 1, 2, 4, 5 (interação entre v_1 e v_2), 7 (interação entre v_1 e v_4), 9 (interação entre v_2 e v_4) e 12 (interação entre v_1 , v_2 e v_4) foram que apresentaram maior porcentagem e influência na resposta, totalizando em 88%. Na FIGURA 4.14B podem ser observadas três retas: uma azul e duas em vermelhas que indicam os intervalos de confiança. Dentro do intervalo de confiança são representados os efeitos insignificantes e, portanto, desconsiderados da matriz. Com base em ambas as figuras anteriores, nenhum efeito que envolva a variável 3 foi significativo para o modelo, portanto a variável 3 pode ser empregada em qualquer nível uma vez que não influencia na resposta obtida com o imunoenensaio.

A nova matriz, contendo somente os efeitos significativos, foi avaliada por meio da mesma rotina anterior. Os valores de variância experimental (53.721,49), erro experimental (231,78), erro de um efeito (115,89) e valor de $t = 2,31$ (grau de liberdade igual a 8) foram recalculados por meio das novas réplicas contidas na matriz e os novos gráficos foram obtidos. A porcentagem de significância dos efeitos recalculados está representada na FIGURA 4.15A e na FIGURA 4.15B estão os efeitos em relação ao intervalo de confiança.

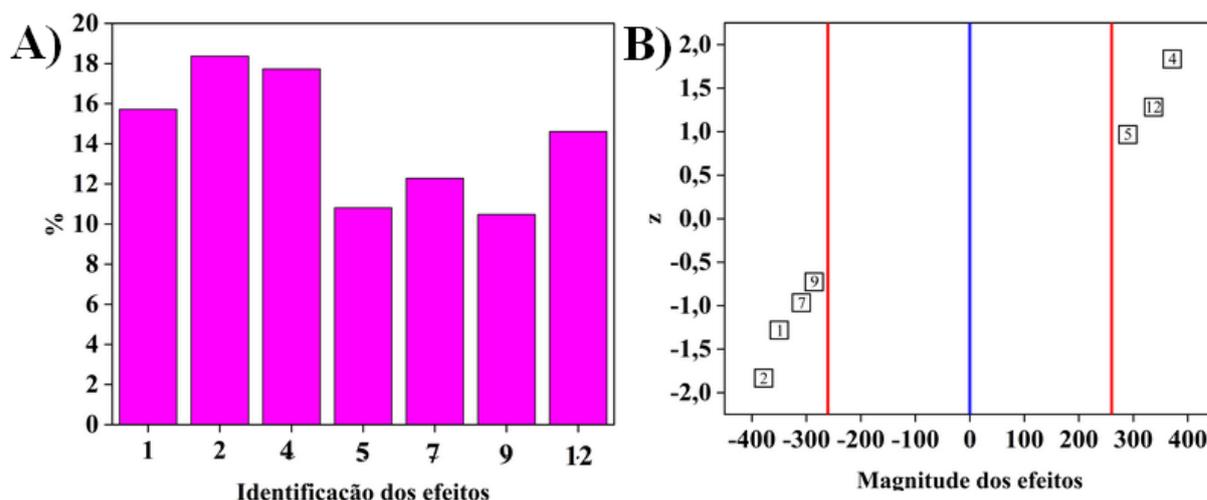


FIGURA 4.15 - Significância dos efeitos considerados significativo pelo modelo anterior referentes as variáveis 1 (C_{PM}), 2 (C_{Pep}), 3 (Tempo de captura) e 4 (Tempo de incubação).

Fonte: A autora.

Como pode ser observado, todos os efeitos selecionados se apresentaram como significativos para o modelo. Sendo assim, os valores de cada efeito e o valor de cada coeficiente (metade do efeito) foram obtidos e são apresentados na TABELA 4.2. Os valores dos coeficientes (b_i) são importantes para determinar a equação do modelo e para gerar os gráficos de contorno.

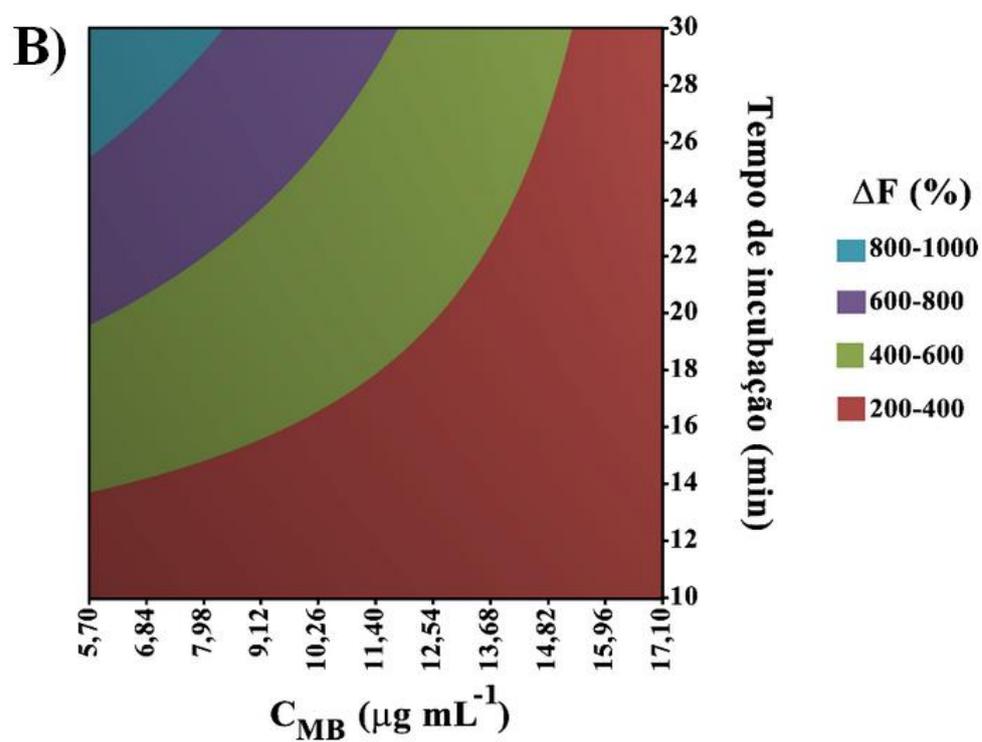
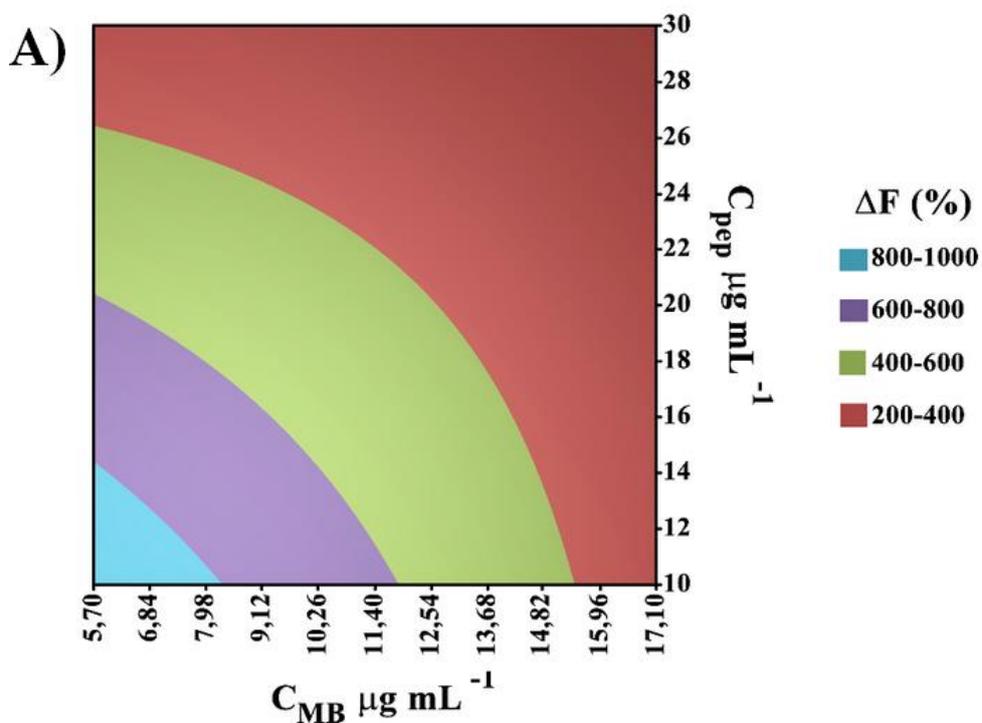
TABELA 4.2 - Valores dos efeitos significativos e os respectivos coeficientes.

Efeito	Interação	Coeficiente		
1	v1	-349,79	b1	-174,90
2	v2	-378,18	b2	-189,09
3	v4	371,51	b4	185,76
4	v1 e v2	290,03	b12	145,02
5	v1 e v4	-309,18	b14	-154,59
6	v2 e v4	-285,61	b24	-142,81
7	v1, v2 e v4	337,26	b124	168,63

Com os valores dos coeficientes significativos do planejamento fatorial 2^3 atual, foi possível determinar a equação que representa o modelo e gerar

os gráficos de contorno a cada duas variáveis conforme apresentado na FIGURA 4.16, a seguir é apresentada a equação do modelo (4.2):

$$\Delta F (\%) = -174,90v_1 - 189,09v_2 + 185,76v_4 + 145,02v_1v_2 - 154,59v_1v_4 - 142,81v_2v_4 \quad \text{Eq 4.2}$$



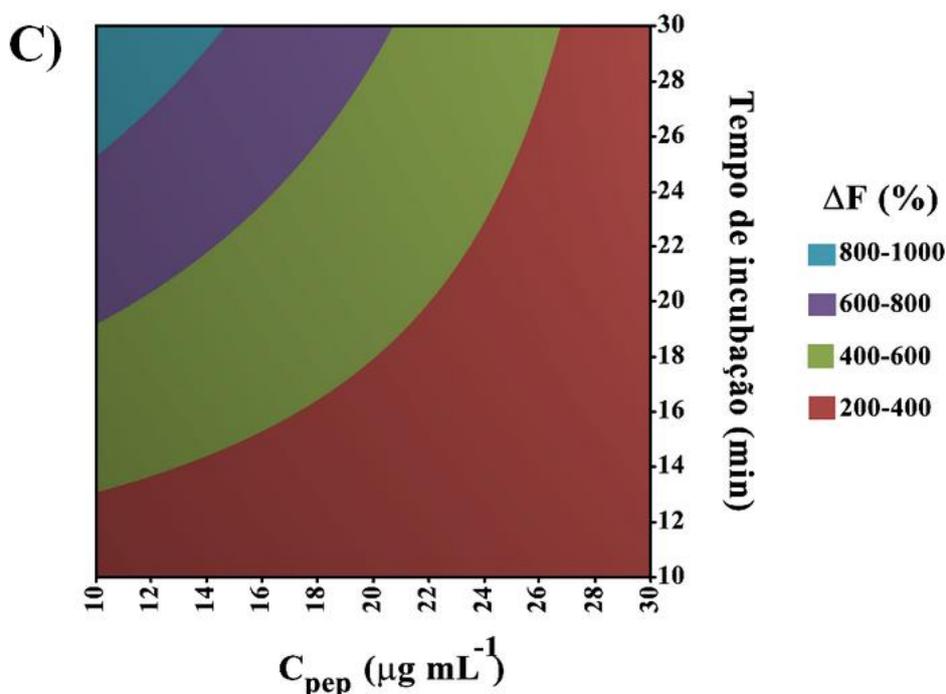


FIGURA 4.16 - Gráficos de contorno referentes ao planejamento fatorial 23 relacionando as variáveis 1 e 2 (A), 1 e 4 (B) e 2 e 4 (C).

Fonte: A autora.

Por fim, no gráfico de contorno é apresentado diferentes regiões, que indicam as condições experimentais possíveis relacionadas a duas variáveis. Como pode ser observado na FIGURA 4.16, as regiões que proporcionam maior ΔF (%) são as de coloração azul claro, sendo as condições escolhidas para os demais estudos. Portanto, a concentração de PM escolhida que foi utilizada na etapa de modificação e ancoramento dos peptídeos foi de $5,7 \mu\text{g mL}^{-1}$. Além disso, a concentração de peptídeo escolhida para a reação de ancoramento nas PMs foi de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ e o tempo de incubação escolhido, para formação do bioconjugado final, foi de 30 min. O tempo de captura, foi escolhido como 10 min uma vez que essa variável não apresentou ser significativa para mudar o resultado de forma eficaz como já discutido anteriormente. Portanto, o tempo total do imunoensaio foi de 40 min. Assim, determinadas as melhores condições para o imunoensaio deu-se continuidade ao trabalho sendo validado o planejamento e em seguida o método foi aplicado nas amostras de cortes de indivíduos saudáveis e pacientes diagnósticos com hanseníase MB.

4.5 Avaliação da repetibilidade e precisão intermediária do magneto-imunoensaio desenvolvido

Uma vez definido os melhores parâmetros experimentais, o imunoensaio foi aplicado em uma mesma amostra de soro. Através de medidas realizadas no mesmo dia (intradia) e medidas realizadas em dias diferentes (interdia) foi possível avaliar a repetibilidade e precisão intermediária, respectivamente. Os resultados intradia obtidos são apresentados na TABELA 4.3.

TABELA 4.3 - Valores de média, desvio-padrão e desvio-padrão relativo referentes aos valores normalizados de corrente para as medidas realizada em um mesmo dia em uma mesma amostra.

ΔF (%)	Média (%)	Desvio-padrão (%)	Desvio-padrão relativo (%)
511,5	529,5	36,9	7,0
591,6			
500,9			
509,0			
534,7			

Na TABELA 4.4 são apresentados os valores de corrente normalizados, a média, desvio-padrão e DPR para as análises realizadas em dias diferentes.

TABELA 4.4 - Valores de média, desvio-padrão e desvio-padrão relativo referentes aos valores normalizados de corrente para as medidas em dias diferentes utilizando uma mesma amostra.

ΔF (%)	Média (%)	Desvio-padrão (%)	Desvio-padrão relativo (%)
500,9	495,4	41,7	8,4
508,8			
505,9			
425,1			
536,4			

Em ambos os estudos, os resultados de DPR para as análises intradia 7,0% e para as análises interdias 8,4%, estão abaixo de 15%, sendo este um limite aceitável para imunoenaios, segundo a literatura ^{112,113}.

4.6 Avaliação do imunoensaio proposto para a detecção de anticorpo anti-*M. leprae* em soro de coortes de indivíduos saudáveis e pacientes diagnósticos com hanseníase MB

O ensaio imuno-magnético proposto mostrou-se capaz de detectar o anticorpo anti-*M. leprae* em amostras de soro. Para avaliar a capacidade do imunoensaio em diagnosticar hanseníase, este foi aplicada em coortes de indivíduos saudáveis e de pacientes diagnosticados com hanseníase multibacilar. Com os resultados obtidos, utilizando o programa MedCalc, construiu-se a curva ROC (Receiver Operating Characteristic) que é uma ferramenta utilizada para avaliar a capacidade de diagnóstico de um método tendo como referência amostras negativas e positivas previamente diagnosticadas por métodos convencionais. A curva ROC obtida é apresentada na FIGURA 4.17. A curva foi obtida por meio das respostas de corrente normalizada, sendo estas, o ΔF (%) para amostras de indivíduos negativos para a doença e positivos classificados como MB. O valor da área sobre a curva (AUC) foi de 0,813, indicando a eficiência do imunoensaio, sendo que quanto mais perto do valor de 1,0, mais eficiente é o método.

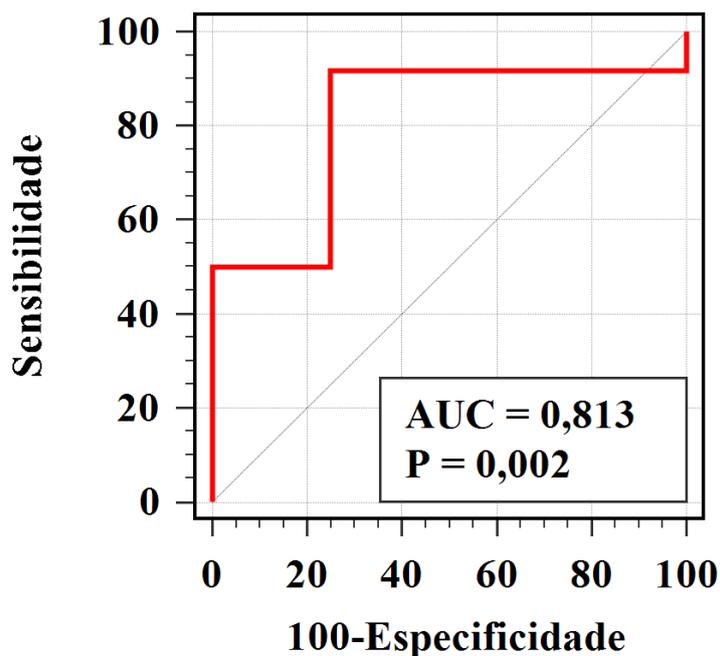


FIGURA 4.17 - Curva ROC obtida aplicando o método proposto em amostra de indivíduos saudáveis e pacientes diagnosticados com hanseníase MB.

Fonte: A autora.

Um gráfico de pontos (FIGURA 4.18) também foi gerado com o mesmo programa que permite avaliar de forma mais simples os conjuntos de resultados obtidos com as amostras negativas e positivas. O valor de corte (linha horizontal) vai indicar os valores referentes aos casos MB e saudáveis, onde o corte foi de $>86,5\%$, sendo valores acima dele são referentes a casos MB. Das amostras de indivíduos saudáveis, apenas três de um total de 12 foram identificadas pelo método como positivas, o que pode indicar um falso-positivo. Já para as amostras MB apenas uma obteve resultado falso-negativo. Para o imunoenensaio proposto, a sensibilidade obtida, ou seja, a capacidade do método de apresentar verdadeiros positivos, foi de 91,7% e a especificidade, sendo a capacidade do método identificar pacientes saudáveis para hanseníase foi 75%.

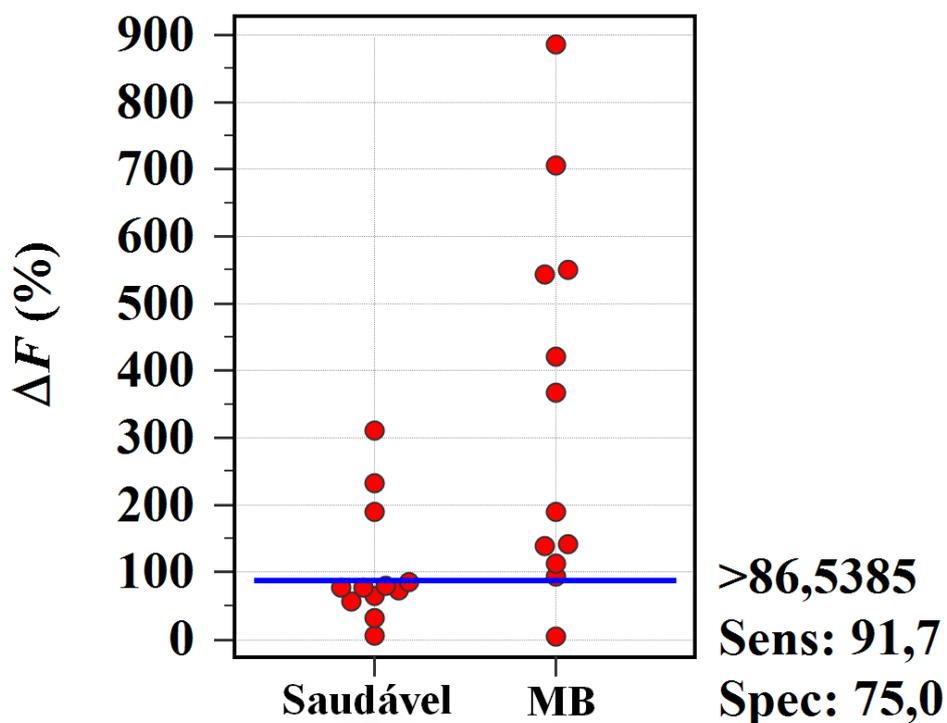


FIGURA 4.18 - Diagrama de pontos referentes aos resultados obtidos com imunoensaio proposto aplicado nas coortes de indivíduos saudáveis e pacientes hansênicos classificados como MB.

Frente aos resultados obtidos, o imunoensaio proposto mostrou-se promissor para diagnóstico de hanseníase MB e capaz de diferenciar indivíduos saudáveis dos pacientes positivos. Apesar no número de amostras utilizadas ser baixo, o método utilizando nanopartículas de prata como marcador eletroquímico e com uso de dispositivo descartável mostrou-se bastante interessante podendo ser uma alternativa simples e de baixo custo para o diagnóstico da hanseníase que poderia vir a ser utilizado no SUS.

5 CONCLUSÕES

Para o desenvolvimento do método proposto neste trabalho, realizamos a síntese de nanopartículas de prata e avaliamos a sua utilização como marcador eletroquímico. As AgNPs sintetizadas apresentaram um tamanho uniforme e a modificação destas com o anticorpo secundário foi considerado bem sucedido, uma vez que o perfil espectrofotométrico do conjugado em comparação com as nanopartículas puras obteve menor absorvância, sendo um indicativo da ocorrência da ligação. As otimizações univariadas realizadas foram importantes para encontrar as condições mais eficientes do imunoensaio e assim obter a melhor resposta eletroquímica com maior diferenciação entre o branco e uma amostra referência, no caso soro de paciente diagnosticado com hanseníase MB. O planejamento fatorial realizado, permitiu encontrar as melhores condições para a concentração de peptídeo sintético e das partículas magnéticas, ambos utilizados na etapa de modificação das PMs com os peptídeos, além dos tempos de incubação necessários para a formação do bioconjugado final. A avaliação da precisão intermediária e repetibilidade apresentaram valores de DPR menores de 15%, o que é aceitável para imunoensaios. Portanto, pode-se considerar que o planejamento foi bem-sucedido, sendo possível encontrar as melhores condições para as variáveis estudadas.

Por fim, o estudo da eficiência do imunoensaio mostrou que ele possui sensibilidade e especificidade clínica de 91,7% e 75,0%, respectivamente, sendo valores considerados bons quando se avalia a capacidade de diagnóstico de novos testes. O método proposto apresentou baixa números de falsos positivos e negativos frente as coortes testadas, apesar no baixo número de voluntários avaliados. Sendo assim, o método mostrou-se bastante interessante para o diagnóstico de hanseníase MB, sendo capaz de diferenciar pacientes saudáveis de doentes, podendo ser, portanto, uma possível alternativa simples e de baixo custo para ser aplicado no Sistema Único de Saúde.

6 REFERÊNCIAS

1. Araújo, M. G. *Leprosy in Brazil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* vol. 36 (2003).
2. OMS. Diretrizes para o diagnóstico, tratamento e prevenção da hanseníase. *Organização Mundial da Saúde*. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/274127> (2019).
3. de Oliveira, R. G. Meanings of neglected diseases in the global health agenda: The place of populations and territories. *Ciencia e Saude Coletiva* **23**, 2291–2302 (2018).
4. MINISTÉRIO DA SAÚDE. *GUIA PRÁTICO SOBRE A HANSENÍASE*. (2017).
5. Carvalho, K. A. Discussões em torno da reconstrução do significado da lepra no período pós-sulfônico, Minas Gerais, na década de 1950. *Historia, Ciencias, Saude - Manguinhos* **22**, 541–557 (2015).
6. Letícia Maria Eidt. *Breve História Da Hanseníase: Sua Expansão Do Para as Américas, o Brasil e o Rio Grande Sul e Sua Trajetória Na Saúde Pública Brasileira*. (2004).
7. Maria Lúcia Fernandes Penna & Gerson Oliveira Penna. Leprosy frequency in the world, 1999–2010. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **107**, 3–12 (2012).
8. Sugawara-Mikami, M. *et al.* Pathogenicity and virulence of *Mycobacterium leprae*. *Virulence* vol. 13 1985–2011 Preprint at <https://doi.org/10.1080/21505594.2022.2141987> (2022).
9. Ministério da Saúde. *Boletim Epidemiológico*. (2023).
10. Ministério da Saúde. *Guia Prático Sobre a Hanseníase. Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de Vigilância e Doenças Transmissíveis* (2017).
11. Brasil, M. da S. *Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos. Portaria SCTIE/MS N°54, de 11 de novembro de 2020* http://conitec.gov.br/images/Protocolos/20201113_PCDT_Diabete_Melito_Tipo_2_29_10_20_20_Final.pdf (2022).
12. Goulart, I. M. B. & Goulart, L. R. Leprosy: Diagnostic and control challenges for a worldwide disease. *Archives of Dermatological Research* vol. 300 269–290 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s00403-008-0857-y> (2008).
13. Miola, A. C., Bicudo, N. P., Tsutsui, G. M. & Miot, H. A. Leproma's dermoscopy. *An Bras Dermatol* **95**, 383–385 (2020).
14. Goulart, I. M. B. & Goulart, L. R. Leprosy: Diagnostic and control challenges for a worldwide disease. *Arch Dermatol Res* **300**, 269–290 (2008).
15. Ministério da saúde. *Boletim Epidemiológico*. (2021).
16. Governo do Estado do Ceará. *APRESENTAÇÃO A Secretaria Da Saúde Do Estado Do Ceará (SESA), Por Meio Da Célula De*. (2022).
17. MINISTÉRIO DA SAÚDE SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE E AMBIENTE. *Boletim, Hanseníase*. <https://www.gov.br/saude/pt-br> (2024).
18. Governo do Estado do Ceará. *Implementação de Novo Esquema de Tratamento Da Hanseníase Paucibacilar, No Âmbito Do SUS Hanseníase*. (2021).

19. Ministério da saúde. *HANSENÍASE Conhecendo Estigma, Discriminação e Os Direitos Das Pessoas Acometidas Pela Hanseníase*. (2020).
20. Chen, K. H., Lin, C. Y., Su, S. Bin & Chen, K. T. Leprosy: A Review of Epidemiology, Clinical Diagnosis, and Management. *Journal of Tropical Medicine* vol. 2022 Preprint at <https://doi.org/10.1155/2022/8652062> (2022).
21. Brasil. Boletim Epidemiológico de Hanseníase. in *Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis – DCC* vol. Jan 54 (2022).
22. Alaíde Mader Braga Vidal & Wilson Roberto Catapani. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) immunoassaying versus microscopy: advantages and drawbacks for diagnosing giardiasis. *Sao Paulo Med* **6**, 282–285 (2005).
23. Sctie, P., N^o, M. & Julho, D. DE. *MINISTÉRIO DA SAÚDE SECRETARIA DE CIÊNCIA, TECNOLOGIA, INOVAÇÃO E INSUMOS ESTRATÉGICOS EM SAÚDE A SECRETÁRIA DE CIÊNCIA, TECNOLOGIA, INOVAÇÃO E INSUMOS ESTRATÉGICOS EM*. <http://conitec.gov.br/>. (2022).
24. van Hooij, A. *et al.* BCG-induced immunity profiles in household contacts of leprosy patients differentiate between protection and disease. *Vaccine* **39**, 7230–7237 (2021).
25. 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 Review of Vaccines* vol. 9 209–222 Preprint at <https://doi.org/10.1586/erv.09.161> (2010).
26. Torres, R. T. *et al.* Sensitivity and specificity of multibacillary and paucibacillary leprosy laboratory tests: A systematic review and meta-analysis. *Diagn Microbiol Infect Dis* **100**, (2021).
27. Ministério da Saúde. *PROTOCOLO CLÍNICO E DIRETRIZES TERAPÊUTICAS DA HANSENÍASE*. (2022).
28. Duthie, M. S. *et al.* Rapid quantitative serological test for detection of infection with *Mycobacterium leprae*, the causative agent of leprosy. *J Clin Microbiol* **52**, 613–619 (2014).
29. Paula Vaz Cardoso, L. *et al.* Development of a quantitative rapid diagnostic test for multibacillary leprosy using smart phone technology. *BMC Infect Dis* **13**, (2013).
30. Alhajj, M., Zubair, M. & Farhana, A. *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*. (2024).
31. de Oliveira, A. L. G. *et al.* Diagnostic accuracy of tests using recombinant protein antigens of *Mycobacterium leprae* for leprosy: A systematic review. *Journal of Infection and Public Health* vol. 13 1078–1088 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2019.12.011> (2020).
32. Gurung, P., Gomes, C. M., Vernal, S. & Leeflang, M. M. G. Diagnostic accuracy of tests for leprosy: a systematic review and meta-analysis. *Clinical Microbiology and Infection* vol. 25 1315–1327 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.05.020> (2019).
33. Rhouati, A., Teniou, A., Badea, M. & Marty, J. L. Analysis of recent bio-/nanotechnologies for coronavirus diagnosis and therapy. *Sensors* vol. 21 1–17 Preprint at <https://doi.org/10.3390/s21041485> (2021).
34. Chen, P. Y. *et al.* The early detection of immunoglobulins via optical-based lateral flow immunoassay platform in COVID-19 pandemic. *PLoS One* **16**, (2021).

35. Pierneef, L. *et al.* Detection of anti-m. Leprae antibodies in children in leprosy-endemic areas: A systematic review. *PLoS Negl Trop Dis* **15**, (2021).
36. Torres, R. T. *et al.* Sensitivity and specificity of multibacillary and paucibacillary leprosy laboratory tests: A systematic review and meta-analysis. *Diagn Microbiol Infect Dis* **100**, (2021).
37. Adelaide J. Vaz, Joilson O. Martins, Kioko Takei & Ednéia Casagrande Bueno. *Imunoensaios Fundamentos e Aplicações*. (Rio de Janeiro, 2018).
38. 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**, 905-913.e6 (2020).
39. Han, Y. *et al.* Innate and Adaptive Immune Responses Against Microsporidia Infection in Mammals. *Frontiers in Microbiology* vol. 11 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01468> (2020).
40. Bowen, A. & Casadevall, A. The Role of the Constant Region in Antibody-Antigen Interactions: Redefining the Modular Model of Immunoglobulin Structure. in *Structural Biology in Immunology: Structure and Function of Novel Molecules of Immunologic Importance* 145–170 (Elsevier, 2018). doi:10.1016/B978-0-12-803369-2.00006-1.
41. Kellie, S. & Al-Mansour, Z. *Micro-and Nanotechnology in Vaccine Development*. *Micro- and Nanotechnology in Vaccine Development* (2017) doi:10.1016/B978-0-323-39981-4/00004-X.
42. Valle De Almeida, S. DESENVOLVIMENTO DE UM MAGNETO-IMUNOENSAIO MICROFLUÍDICO COM DETECÇÃO ELETROQUÍMICA PARA DIAGNÓSTICO DE HANSENÍASE. (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, São Carlos, 2023).
43. Nimmerjahn, F., Vidarsson, G. & Cragg, M. S. Effect of posttranslational modifications and subclass on IgG activity: from immunity to immunotherapy. *Nature Immunology* vol. 24 1244–1255 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41590-023-01544-8> (2023).
44. Cowan, R. J., Douglas Maynard, ; C, Witcofski, R. L., Janeway, R. & Toole, J. F. *Selenomethionine Se 75 Thymus Scans in Myasthenia Gravis*. <http://jama.jamanetwork.com/>.
45. Boes, M. Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses. *Mol Immunol* **37**, (2000).
46. Unninayar, D., Shea, B., Cameron, D. W. & Cowan, J. Levels of immunoglobulin isotypes in serum and respiratory samples of patients with chronic obstructive pulmonary disease: Protocol for a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open* **13**, (2023).
47. Labuda, J. *et al.* Terminology of bioanalytical methods (IUPAC Recommendations 2018). *Pure and Applied Chemistry* **90**, 1121–1198 (2018).
48. de Campos, D. A. R., Rocha, J. G., Castro, R. N. & de Oliveira, I. R. W. Z. Electrochemical Biosensors Based on Peroxidase: A Review. *Revista Virtual de Química* vol. 15 759–778 Preprint at <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20220127> (2023).
49. Dalkiran, B. Amperometric determination of heavy metal using an HRP inhibition biosensor based on ITO nanoparticles-ruthenium (III) hexamine trichloride composite: Central composite design optimization. *Bioelectrochemistry* **135**, (2020).

50. Yáñez-Sedeño, P., Agüí, L., Villalonga, R. & Pingarrón, J. M. Biosensors in forensic analysis. A review. *Analytica Chimica Acta* vol. 823 1–19 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.03.011> (2014).
51. Kurbanoglu, S., Erkmen, C. & Uslu, B. Frontiers in electrochemical enzyme based biosensors for food and drug analysis. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* vol. 124 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.115809> (2020).
52. Faria, H. A. M. & Zucolotto, V. Label-free electrochemical DNA biosensor for zika virus identification. *Biosens Bioelectron* **131**, 149–155 (2019).
53. Pawliszyn, Janusz., Bayona, J. M., Lord, H. L., Le, X. Chris. & Mondello, Luigi. *Comprehensive Sampling and Sample Preparation : Analytical Techniques for Scientists*. (Elsevier, 2012).
54. Israel, A. *et al.* Large-Scale Study of Antibody Titer Decay Following BNT162b2 mRNA Vaccine or SARS-CoV-2 Infection. *Vaccines (Basel)* **10**, (2022).
55. John S Spencer *et al.* Identification of serological biomarkers of infection, disease progression and treatment efficacy for leprosy. (2012) doi:10.1590/s0074.
56. 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**, 146–152 (2014).
57. Machado, A. *et al.* *SÍNTESES QUÍMICA E ENZIMÁTICA DE PEPTÍDEOS: PRINCÍPIOS BÁSICOS E APLICAÇÕES*. *Quim. Nova* vol. 27 (2004).
58. Gorouhi, F. & Maibach, H. I. Role of topical peptides in preventing or treating aged skin. *International Journal of Cosmetic Science* vol. 31 327–345 Preprint at <https://doi.org/10.1111/j.1468-2494.2009.00490.x> (2009).
59. Demolombe, V. *et al.* Benchmarking the PEPOP methods for mimicking discontinuous epitopes. *BMC Bioinformatics* **20**, (2019).
60. Gómara, M. J. & Haro, I. *Synthetic Peptides for the Immunodiagnosis of Human Diseases*. (2007).
61. Sfragano, P. S., Moro, G., Polo, F. & Palchetti, I. The role of peptides in the design of electrochemical biosensors for clinical diagnostics. *Biosensors* vol. 11 Preprint at <https://doi.org/10.3390/bios11080246> (2021).
62. Pandey, S., Malviya, G. & Chottova Dvorakova, M. Role of peptides in diagnostics. *Int J Mol Sci* **22**, (2021).
63. Gahoi, S. *et al.* Computational screening for new inhibitors of *M. tuberculosis* mycolyltransferases antigen 85 group of proteins as potential drug targets. in *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* vol. 31 30–43 (2013).
64. Williams, D. L. *et al.* Biological implications of *Mycobacterium leprae* gene expression during infection. *J Mol Microbiol Biotechnol* **8**, 58–72 (2004).
65. Soares, B. A. *et al.* Epitope mapping from *Mycobacterium leprae* proteins: Convergent data from in silico and in vitro approaches for serodiagnosis of leprosy. *Mol Immunol* **138**, 48–57 (2021).

66. Alban, S. M. *et al.* Phage Display and Synthetic Peptides as Promising Biotechnological Tools for the Serological Diagnosis of Leprosy. *PLoS One* **9**, e106222 (2014).
67. Chandra K. Dixita *et al.* Electrochemistry-based Approaches to Low Cost, High Sensitivity, Automated, Multiplexed Protein Immunoassays for Cancer Diagnostics. in *AIChE Annual Meeting, Conference Proceedings* vols 2019-November (2019).
68. Ben Ismail, M. *et al.* Using magnetic beads and signal amplifiers to produce short and simple immunoassays: Application to MMP-9 detection in plasma samples. *Anal Chim Acta* **999**, 144–154 (2018).
69. Ecke, A., Westphalen, T., Hornung, J., Voetz, M. & Schneider, R. J. A rapid magnetic bead-based immunoassay for sensitive determination of diclofenac. *Anal Bioanal Chem* **414**, 1563–1573 (2022).
70. JOSÉ RAIMUNDO ARAUJO DE AZEVEDO *et al.* Procalcitonin as a prognostic biomarker of severe sepsis and septic shock. *Rev. Col. Bras.* **39**, 456–460 (2012).
71. Guimarães, M. L., Amarante, J. F. & de Oliveira, H. P. The importance of essential oils in the green synthesis of metallic nanoparticles. *Revista Materia* **26**, (2021).
72. Almeida, J. C. B. *et al.* SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA.
73. Alves Melo Jr, M., Samuel Soares Santos, L. & do Carmo Gonçalves Ana Flávia Nogueira, M. PREPARAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA E OURO: UM MÉTODO SIMPLES PARA A INTRODUÇÃO DA NANOCIÊNCIA EM LABORATÓRIO DE ENSINO. *Quim. Nova* vol. 35 (2012).
74. Abou El-Nour, K. M. M., Eftaiha, A., Al-Warthan, A. & Ammar, R. A. A. Synthesis and applications of silver nanoparticles. *Arabian Journal of Chemistry* vol. 3 135–140 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2010.04.008> (2010).
75. Khomutov, G. B. & Gubin, S. P. *Interfacial Synthesis of Noble Metal Nanoparticles*. www.elsevier.com/locate/msec (2002).
76. Oliveira, M. M., Ugarte, D., Zanchet, D. & Zarbin, A. J. G. Influence of synthetic parameters on the size, structure, and stability of dodecanethiol-stabilized silver nanoparticles. *J Colloid Interface Sci* **292**, 429–435 (2005).
77. Shirtcliffe, N., Nickel, U. & Schneider, S. *Reproducible Preparation of Silver Sols with Small Particle Size Using Borohydride Reduction: For Use as Nuclei for Preparation of Larger Particles*. <http://www.idealibrary.com> (1999).
78. Bai, J. *et al.* One-pot synthesis of polyacrylamide-gold nanocomposite. *Mater Chem Phys* **106**, 412–415 (2007).
79. Bazilio, F. S. *et al.* Detection and quantification of silver nanoparticles by spICP-MS. *Quim Nova* **44**, 868–873 (2021).
80. Carlos, S., Antonio, E., Neto, B., Ribeiro, C. & Zucolotto, V. Síntese de Nanopartículas de Prata para Aplicação na Sanitização de Embalagens. (2008).
81. Rodrigues, J. F. B. *et al.* Application of statistical method in the study of the influence of hydrogen peroxide and sodium borohydride on silver nanoparticle synthesis (AGNPS). *Revista Materia* **24**, (2019).

82. de Brito, E. C. P. *et al.* Quantification of silver nanoparticles in a pharmaceutical product by spectrophotometry and potentiometry: A proposal for practical classes in analytical chemistry. *Quim Nova* **44**, 105–111 (2021).
83. Orbaek, A. W., McHale, M. M. & Barron, A. R. Synthesis and characterization of silver nanoparticles for an undergraduate laboratory. *J Chem Educ* **92**, 339–344 (2015).
84. Choi, H. K. & Yoon, J. Nanotechnology-Assisted Biosensors for the Detection of Viral Nucleic Acids: An Overview. *Biosensors* vol. 13 Preprint at <https://doi.org/10.3390/bios13020208> (2023).
85. Yang, Y., Shu, Y., Wu, Y. & Gao, Q. Co-tuning composition and channel-rich structure of Ag-Pd alloys toward sensitive electrochemical biosensing. *Chemical Engineering Journal* **425**, (2021).
86. Choi, H. K., Lee, M. J., Lee, S. N., Kim, T. H. & Oh, B. K. Noble Metal Nanomaterial-Based Biosensors for Electrochemical and Optical Detection of Viruses Causing Respiratory Illnesses. *Frontiers in Chemistry* vol. 9 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.672739> (2021).
87. Wei-Wen Hsiao, W. *et al.* Nanomaterial-based biosensors for avian influenza virus: A new way forward. *Talanta* vol. 265 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2023.124892> (2023).
88. Hao, N. *et al.* An electrochemical immunosensing method based on silver nanoparticles. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **656**, 50–54 (2011).
89. Paimard, G., Ghasali, E. & Baeza, M. Screen-Printed Electrodes: Fabrication, Modification, and Biosensing Applications. *Chemosensors* vol. 11 Preprint at <https://doi.org/10.3390/chemosensors11020113> (2023).
90. Wang, J., Tian, B., Nascimento, V. B. & Angnes, L. Performance of screen-printed carbon electrodes fabricated from different carbon inks. *Electrochim Acta* **43**, 3459–3465 (1998).
91. Couto, R. A. S., Lima, J. L. F. C. & Quinaz, M. B. Recent developments, characteristics and potential applications of screen-printed electrodes in pharmaceutical and biological analysis. *Talanta* **146**, 801–814 (2016).
92. Torre, R., Costa-Rama, E., Nouws, H. P. A. & Delerue-Matos, C. Screen-Printed Electrode-Based Sensors for Food Spoilage Control: Bacteria and Biogenic Amines Detection. *Biosensors (Basel)* **10**, 139 (2020).
93. Parate, K. *et al.* Aerosol-Jet-Printed Graphene Immunosensor for Label-Free Cytokine Monitoring in Serum. *ACS Appl Mater Interfaces* **12**, 8592–8603 (2020).
94. Gowers, S. A. N. *et al.* 3D Printed Microfluidic Device with Integrated Biosensors for Online Analysis of Subcutaneous Human Microdialysate. *Anal Chem* **87**, 7763–7770 (2015).
95. Taleat, Z., Khoshroo, A. & Mazloum-Ardakani, M. Screen-printed electrodes for biosensing: A review (2008-2013). *Microchimica Acta* vol. 181 865–891 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s00604-014-1181-1> (2014).
96. Sher, M., Faheem, A., Asghar, W. & Cinti, S. Nano-engineered screen-printed electrodes: A dynamic tool for detection of viruses. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* vol. 143 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116374> (2021).
97. Hannah, S. *et al.* Rapid antibiotic susceptibility testing using low-cost, commercially available screen-printed electrodes. *Biosens Bioelectron* **145**, (2019).

98. Ferreira, D. C., Batistuti, M. R., Bachour, B. & Mulato, M. Aptasensor based on screen-printed electrode for breast cancer detection in undiluted human serum. *Bioelectrochemistry* **137**, (2021).
99. Gomes, N. O., Mendonça, C. D., Machado, S. A. S., Oliveira, O. N. & Raymundo-Pereira, P. A. Flexible and integrated dual carbon sensor for multiplexed detection of nonylphenol and paroxetine in tap water samples. *Microchimica Acta* **188**, (2021).
100. Catunda, L. G. da S. *et al.* SARS-CoV-2 detection enabled by a portable and label-free photoelectrochemical genosensor using graphitic carbon nitride and gold nanoparticles. *Electrochim Acta* **451**, (2023).
101. Leau, S. A., Lete, C. & Lupu, S. Nanocomposite Materials based on Metal Nanoparticles for the Electrochemical Sensing of Neurotransmitters. *Chemosensors* vol. 11 Preprint at <https://doi.org/10.3390/chemosensors11030179> (2023).
102. 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**, 381–387 (2016).
103. Modenez, I. A., Sastre, D. E., Moares, F. C. & Marques Netto, C. G. C. Influence of glutaraldehyde cross-linking modes on the recyclability of immobilized lipase b from candida antarctica for transesterification of soy bean oil. *Molecules* **23**, (2018).
104. THERMO FISHER. Dynabeads® MyOne™ Carboxylic Acid .
105. Pereira, F. M. V. & Pereira-Filho, E. R. Application of free computational program in experimental design: A tutorial. *Quim Nova* **41**, 1061–1071 (2018).
106. Solomon, S. *et al.* *Synthesis and Study of Silver Nanoparticles*. www.JCE.DivCHED.org (2007).
107. Durán, N., Rolim, W. R., Durán, M., Fávaro, W. J. & Seabra, A. B. Nanotoxicology of silver nanoparticles: Toxicity in animals and humans. *Quim Nova* **42**, 206–213 (2019).
108. Wu, K. H., Huang, W. C., Shyu, R. H. & Chang, S. C. Silver nanoparticle-base lateral flow immunoassay for rapid detection of Staphylococcal enterotoxin B in milk and honey. *J Inorg Biochem* **210**, 111163 (2020).
109. Beck, F., Horn, C. & Bäumner, A. J. Ag nanoparticles outperform Au nanoparticles for the use as label in electrochemical point-of-care sensors. (2021) doi:10.1007/s00216-021-03288-6/Published.
110. A. Vogel. *Química Analítica Qualitativa*. (Mestre Jou, São Paulo, 1981).
111. Dougl A. Skoog, Donald M. West & James F. Holler. *Fundamento de Química Analítica*. (São Paulo, 2009).
112. Vashist, S. K. & Luong, J. H. T. Bioanalytical requirements and regulatory guidelines for immunoassays. in *Handbook of Immunoassay Technologies: Approaches, Performances, and Applications* 81–95 (Elsevier, 2018). doi:10.1016/B978-0-12-811762-0.00004-9.
113. Shah, V. P. *et al.* *Bioanalytical Method Validation-A Revisit with a Decade of Progress*. (2000).