

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

VINICIUS CAUAN MENDES DA SILVA

IMUNOENSAIO DE FLUXO LATERAL PARA DETECÇÃO DA TUBERCULOSE

SÃO CARLOS

2022

VINICIUS CAUAN MENDES DA SILVA

IMUNOENSAIO DE FLUXO LATERAL PARA DETECÇÃO DA TUBERCULOSE

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Bacharelado em Biotecnologia, da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar – Campus São Carlos), como requisito para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Dra. Isabella Sampaio do Nascimento (IFSC – USP)

Co-orientadora: Dra. Maria Cristina da Silva Prachevicius (DGE/UFSCar)

SÃO CARLOS

2022

VINICIUS CAUAN MENDES DA SILVA

IMUNOENSAIO DE FLUXO LATERAL PARA DETECÇÃO DA TUBERCULOSE

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Bacharelado em Biotecnologia, da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar – Campus São Carlos), como requisito para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA:

Membros efetivos:

Prof. Dr. Nirton Cristi Silva Vieira

Dra. Giovana Rosso Cagnani

Local: Sala 10 do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos (DGE/UFSCar)

Data: 09 de novembro de 2022

Horário: 09h00

SÃO CARLOS

2022

À minha mãe, Daniela, e à minha avó, Cida,
pelo suporte, confiança e inspiração. Amo
vocês. Imensamente.

AGRADECIMENTOS

Às agências de fomento científico, principalmente Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo financiamento para execução do projeto.

À Universidade Federal de São Carlos, pelas tantas oportunidades para minha formação pessoal e acadêmica.

À Universidade de São Paulo e ao Instituto de Física de São Carlos, pela infraestrutura fornecida para o desenvolvimento do projeto.

À minha orientadora Dr. Isabella Sampaio do Nascimento, por ter confiado em mim durante toda minha jornada no laboratório e proporcionado tantas oportunidades de trabalho e aprendizado. Agradeço pela orientação, incentivo e ensinamentos (e broncas).

A todos do Grupo de Nanomedicina e Nanotoxicologia (GNano) que pude conhecer nesses últimos anos e que me ajudaram imensamente, principalmente à secretária Simone e ao Prof. Dr. Valtencir Zucolotto, agradeço pelo suporte.

Aos professores que contribuíram para a minha a formação, a qual foi fundamental para a escrita e execução deste trabalho, e ao secretário Rodrigo, agradeço por todos os aprendizados e suporte.

À Profa. Dra. Maria Cristina Pranchevicius, pelo apoio, ensinamentos e amizade.

Aos meus amigos de faculdade, Conny Fukuyama, Felipe Ribaldo, Jaiane Santana, Lucca Policastro, Marco Túlio, Maria Júlia, entre outros, que se tornaram fundamentais e parte da minha vida desde o primeiro contato na faculdade, com os quais compartilhei os melhores momentos da graduação, agradeço pelos ensinamentos, confiança, apoio e, principalmente, amizade.

A todos da minha família, agradeço pelo carinho, apoio e confiança.

A minha avó dona Cida e mainha Daniela, agradeço por todo suporte durante minha graduação e pela oportunidade e confiança no meu potencial. Vocês são o que me motiva a continuar e não desistir. Agradeço. Novamente. Imensamente.

RESUMO

A tuberculose é a principal causa de mortes entre as doenças infecciosas, segundo a Organização Mundial da Saúde, e representa um grande problema para a saúde pública. Cerca de 1,4 milhões de pessoas morreram em decorrência da tuberculose no mundo em 2019, sendo que no Brasil registram-se cerca de 4.500 casos por ano desde 2010. O diagnóstico precoce da tuberculose é essencial para que o tratamento seja mais eficiente, evitando terapias inespecíficas que contribuem para o surgimento de formas resistentes do patógeno. Os métodos de diagnóstico atuais, como ensaios imunológicos e testes moleculares, necessitam de infraestrutura e profissionais especializados, comprometendo o diagnóstico em locais com poucos recursos. Nesse sentido, novos biomarcadores vêm sendo pesquisados para a construção de novas ferramentas de diagnóstico. Entre esses biomarcadores, temos as proteínas Hsp65 e CFP-10, as quais são encontradas em diferentes amostras de pacientes com tuberculose e são secretadas em fases iniciais da infecção. Diante disso, o presente estudo apresenta o desenvolvimento de um imunossensor baseado em papel para a detecção simultânea das proteínas Hsp65 e CFP-10 usando um sistema de fluxo lateral. Para isso, os biomarcadores foram imobilizados na membrana de nitrocelulose para detecção por meio do modelo competitivo, em um dispositivo composto pela zona de amostra, de detecção e de absorção. Nanopartículas de ouro foram funcionalizadas com os anticorpos respectivos dos alvos para atuarem como rótulos de detecção. Após a otimização do imunossensor em diferentes parâmetros experimentais, como volume de amostra e tempo de incubação, foi possível construir curvas de calibração para ambos os biomarcadores para a faixa de concentração de $2,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e $40 \mu\text{mol.L}^{-1}$. O dispositivo apresentou várias vantagens em relação aos métodos de diagnóstico já utilizados, como baixo custo, fácil uso e detecção rápida e qualitativa a olho nu, fornecendo uma ferramenta promissora para o diagnóstico da tuberculose no ponto de atendimento.

Palavras-chave: Tuberculose; diagnóstico rápido; imunossensor; papel; fluxo lateral; biomarcadores; Hsp65; CFP-10.

ABSTRACT

Tuberculosis is the leading cause of death among infectious diseases, according to the World Health Organization, and represents a major public health problem. About 1.4 million people died from tuberculosis worldwide in 2019, with about 4,500 cases per year in Brazil since 2010. Early diagnosis of tuberculosis is essential for treatment to be more efficient, avoiding nonspecific therapies that contribute to the emergence of resistant forms of the pathogen. Current diagnostic methods, such as immunoassays and molecular tests, require infrastructure and specialized professionals, compromising diagnosis in low-resource settings. In this sense, new biomarkers have been researched for the development of new diagnostic tools. Among these biomarkers, we have the Hsp65 and CFP-10 proteins, which are found in different samples from tuberculosis patients and are secreted in the early stages of infection. Therefore, the present study presents the development of a paper-based immunosensor for the simultaneous detection of Hsp65 and CFP-10 proteins using a lateral flow system. For this, the biomarkers were immobilized on the nitrocellulose membrane for detection through the competitive model, in a device composed of the sample, detection, and absorption zone. Gold nanoparticles were functionalized with antibodies against the targets to act as detection labels. After optimizing the immunosensor in different experimental parameters, such as sample volume and incubation time, it was possible to build calibration curves for both biomarkers for the concentration range of $2.5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ and $40 \mu\text{mol.L}^{-1}$. The device presented several advantages over the diagnostic methods already used, such as low-cost, easy-to-use, fast results detectable with the naked eye, providing a promising tool for the diagnosis of tuberculosis at the point of care.

Keywords: Tuberculosis; rapid diagnosis; immunosensor; paper; lateral flow; biomarkers; Hsp65; CFP-10.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Tuberculose extrapulmonar, na qual o patógeno bacteriano acomete outros órgãos do corpo, e a tuberculose pulmonar, caracterizada pela forma latente e ativa da doença, com acometimento dos pulmões.	9
Figura 2 - Princípio de funcionamento de um biossensor e sua composição, exemplificado por um dispositivo para detecção de glicose (glicosímetro).	12
Figura 3 - Comparativo entre os modelos de detecção sanduíche e competitivo.	16
Figura 4 - Dispositivo completo, com as diferentes zonas e suas respectivas biomoléculas.	22
Figura 5 - Procedimento experimental para realização dos testes de detecção e otimização.	22
Figura 6 - Esquema da detecção colorimétrica do imunoenensaio.	23
Figura 7 - Análise quantitativa usando o ImageJ. (A) Abertura do arquivo contendo a foto da(s) tira(s). (B) Divisão da imagem nos canais RGB, seleção do canal e demarcação da região a ser analisada. (C) Extração do perfil gráfico e dos valores de intensidades para aplicação em softwares de análise de dados.	24
Figura 8 - Dispositivo projetado para a detecção individual dos biomarcadores.	25
Figura 9 - Testes iniciais para a detecção de CFP-10, sendo LT a linha de teste composta pela CFP-10/ESAT-6 e a LC a linha controle.	26
Figura 10 - Testes iniciais para a detecção da Hsp65, sendo LT a linha de teste composta pela Hsp65 e a LC a linha controle.	26
Figura 11 - (A) Tiras após 25 min de corrida das amostras contendo as proteínas na concentração de 40 µg/mL. (B) Detecção quantitativa da intensidade das linhas testes.	27
Figura 12 - Teste de bloqueio dos sítios ativos da tira. Detecção da CFP-10/ESAT-6, Hsp65 e controle negativo para tiras sem etapa de bloqueio e com bloqueio de 5 min usando BSA.	28
Figura 13 - Teste de sonicação do complexo proteico. Detecção da CFP-10/ESAT-6 e controle negativo, com o complexo proteico sonicado durante 5 min e sem sonicação.	29
Figura 14 - Otimização do volume de conjugado. (A) Detecção da CFP-10/ESAT-6, da Hsp65 e controle negativo, testando 5 µL de conjugados (2,5 µL de cada um dos conjugados) e 10 µL de conjugados (5 µL de cada um dos conjugados). (B) Detecção quantitativa da CFP-10/ESAT-6. (C) Detecção quantitativa da Hsp65.	30
Figura 15 - Otimização do volume de amostra. (A) Detecção da CFP-10/ESAT-6, Hsp65 e controle negativo, com volume de amostra de 20 µL e 25 µL. (B) Detecção quantitativa da CFP-10/ESAT-6. (C) Detecção quantitativa da Hsp65.	32
Figura 16 - Otimização do tampão de corrida. Detecção da CFP-10/ESAT-6, Hsp65 e controle negativo, com a utilização do PBS-Tween20 (PBST) e PBS.	33
Figura 17 - Otimização do tempo de incubação. Detecção da CFP-10/ESAT-6, Hsp65 e controle negativo, sem tempo de incubação e com tempo de 5 e 10 min.	34
Figura 18 - Detecção da CFP-10/ESAT-6 com variação da concentração. (B) Curva analítica para a detecção da CFP-10/ESAT-6 ($R^2=0,971$).	35
Figura 19 - Detecção da Hsp65 com variação da concentração. (B) Curva analítica para a detecção da Hsp65 ($R^2=0,984$).	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros utilizados para o teste de otimização do volume de conjugado.	30
Tabela 2 - Parâmetros utilizados para o teste de otimização do volume de amostra.....	31

SUMÁRIO

1. Introdução	9
1.1 Tuberculose: Epidemiologia e Diagnóstico	9
1.2 Biossensores	11
1.3 Biossensores para diagnóstico da tuberculose	12
1.4 Biossensores baseados em papel	13
1.5 Ensaio de fluxo lateral	15
1.6 Biomarcadores da tuberculose e sua potencialidade para uso em plataformas de diagnóstico rápido	17
2. Objetivos	20
2.1 Objetivos gerais	20
2.2 Objetivos específicos	20
3. Materiais e métodos	21
3.1 Materiais	21
3.2 Métodos	21
3.2.1 Funcionalização das nanopartículas	21
3.2.2 Montagem e modificação dos dispositivos	21
3.2.3 Testes de detecção	22
3.2.4 Otimização dos parâmetros experimentais	23
3.2.5 Análises quantitativas	24
4. Resultados e discussão	25
4.1 Detecção isolada do complexo proteico CFP-10/ESAT-6 e Hsp65	25
4.2 Testes de detecção: CFP-10-ESAT-6 e Hsp65	26
4.3 Testes de otimização	28
4.3.1 Bloqueio da membrana	28
4.3.2 Sonicação do complexo CFP-10/ESAT-6	29
4.3.3 Volume de conjugado	29
4.3.4 Volume de amostra	31
4.3.5 Tampão de corrida	33
4.3.6 Tempo de incubação	33
4.4 Construção das curvas analíticas	34
4.4.1 Curva analítica: CFP-/ESAT-6	34
4.4.2 Curva analítica: Hsp65	35
5. Conclusões e perspectivas	37
6. Referências bibliográficas	38

1. Introdução

1.1 Tuberculose: Epidemiologia e Diagnóstico

A tuberculose (TB) é uma doença causada pela bactéria *Mycobacterium tuberculosis* e é transmitida pelo ar, por exemplo através da fala, tosse ou espirro (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020). A forma mais comum da doença é a pulmonar, na qual o patógeno infecta os pulmões (CENTERS FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION, 2018). Todavia, mais de 20% dos casos da doença é representado pela forma extracelular da doença, na qual, em pessoas imunocomprometidas, o patógeno acomete outros órgãos, como olhos e o trato gastrointestinal (ALLAHYARTORKAMAN *et al.*, 2019). A *Mycobacterium tuberculosis* tem a capacidade de permanecer em um estado inativo no indivíduo, desencadeando a chamada infecção latente da TB. Nesse caso, os indivíduos não apresentam quaisquer sintomas e não atuam como transmissores do agente (CENTERS FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION, 2018). Segundo o Centro de Controle e Prevenção de Doença (CDC), a TB pulmonar apresenta sintomas clássicos, como tosse e dores torácicas, que podem ser acompanhados de febre, fadiga e perda de peso; enquanto a forma extracelular apresenta sintomas variados de acordo com o local em que o indivíduo está acometido pela bactéria.

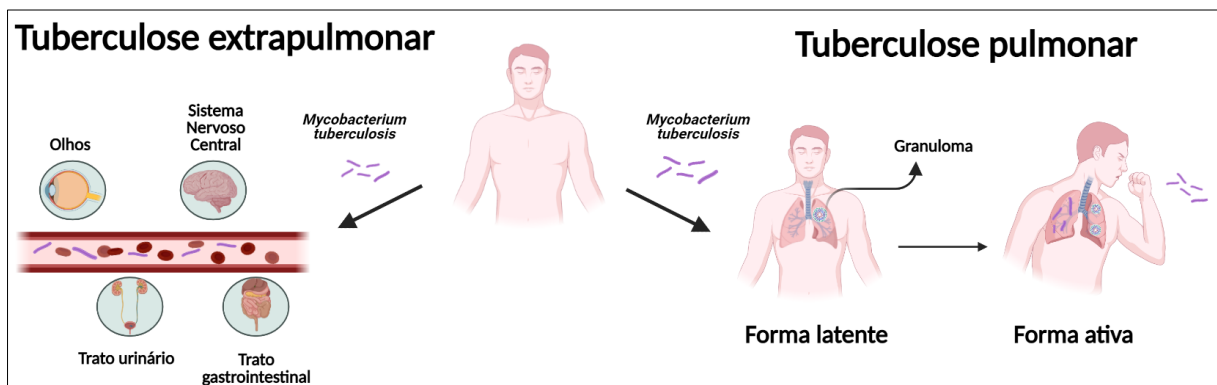


Figura 1 - Tuberculose extrapulmonar, na qual o patógeno bacteriano acomete outros órgãos do corpo, e a tuberculose pulmonar, caracterizada pela forma latente e ativa da doença, com acometimento dos pulmões.

Fonte: Elaborado pelo autor (Biorender.com).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a TB ainda é um problema sério de saúde pública, sendo a principal causa de mortes entre as doenças causadas por agentes infecciosos únicos até a chegada da pandemia de COVID-19. Em 2020, cerca de 10 milhões de pessoas contraíram a TB no mundo, dentre as quais, aproximadamente 1,3 milhões morreram em decorrência da infecção. O aumento na taxa de mortalidade da TB, comparada com o ano de 2019, é reflexo dos impactos da pandemia da COVID-19. A subnotificação de casos

aumentou, devido, por exemplo, preocupações relacionadas à exposição ao vírus e as semelhanças entre os sintomas da TB e COVID-19 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021). No Brasil, a carga viral é uma das mais altas, classificando-o como um país prioritário para controle da doença segundo a OMS. Em 2021, aproximadamente 68 mil casos foram relatados, que representa uma taxa de incidência de 32,0 casos/100 mil habitantes, menor do que a taxa de 37,1 casos/100 mil habitantes registrada no ano de 2019. Tais números são reflexo da pandemia, visto que houve uma diminuição nas notificações dos casos desde 2019, além de uma diminuição no consumo de testes rápidos moleculares para a doença. Em relação ao número de óbitos, desde 2011 registra-se entre 4.500 e 4.600 casos por ano, representando um coeficiente de cerca de 2,2 óbitos/100 mil habitantes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022).

O diagnóstico inicial da TB é feito com base no quadro clínico do indivíduo, por meio da observação dos principais sintomas relatados pelos indivíduos somado com a análise dos aspectos epidemiológicos, como histórico de contato com pessoas infectadas e até mesmo condições crônicas (por exemplo, *diabetes mellitus*). Entretanto, o diagnóstico da TB precisa ser confirmado por meio da identificação da bactéria, visto que os sintomas geralmente não são específicos o suficiente para um diagnóstico preciso e, conseqüentemente, início de um tratamento precoce eficiente (SULIS *et al.*, 2016). O tratamento inadequado de pacientes devido a um diagnóstico inespecífico tem contribuído para o aumento no número de casos de tuberculose em que o patógeno se tornou resistente aos principais medicamentos usados no tratamento da doença (KHAWBUNG; NATH; CHAKRABORTY, 2021; FURIN; COX; PAI, 2019). Os métodos de diagnósticos convencionais da tuberculose incluem a radiografia do tórax, baciloscopia de escarro e a cultura de escarro. Entretanto, tais métodos apresentam suas limitações. Enquanto na radiografia de tórax há a exposição à radiação e apresenta baixa especificidade – visto que não apresenta um caráter etiológico e nem é capaz de detectar a infecção latente -, a baciloscopia de escarro apresenta uma baixa sensibilidade e não é capaz de discriminar a *Mycobacterium tuberculosis* da infecção de outras micobactérias não tuberculosas. Além disso, apesar da cultura de escarro ser o método padrão e apresentar uma alta sensibilidade, o resultado leva cerca de 2 a 8 semanas, o que pode retardar o início do tratamento (ACHARYA *et al.* 2020; SAKTIAWATI *et al.* 2019). Ademais, esses métodos necessitam de laboratórios com infraestrutura de alto nível e profissionais altamente qualificados.

Diante das limitações das metodologias convencionais, algumas técnicas foram desenvolvidas com base na detecção de produtos liberados pela bactéria durante sua replicação

no hospedeiro, como a lipoarabinoma (LAM), a qual é usada como alvo no teste LF-LAM (do inglês, *lateral flow urine lipoarabinomannan*) (FURIN; COX; PAI, 2019). Entretanto, esse teste tem um desempenho melhor em pacientes com a doença avançada e HIV-positivos, os quais formam os grupos indicados pela OMS para realização do LF-LAM (RICKS *et al.*, 2020). Outras técnicas moleculares de diagnóstico rápido foram desenvolvidas, dentre as quais podemos citar: Xpert MTB/RIF (teste de reação em cadeia da polimerase baseado em cartucho e automatizado), teste de amplificação isotérmica mediada por loop (do inglês, *loop-mediated isothermal amplification* - LAMP) e Truenat™ MTB (teste de amplificação de ácido nucleico baseado em chip) (HAN *et al.*, 2021; NIKAM *et al.*, 2013; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020). Entretanto, apesar dessas tecnologias serem sensíveis e rápidas para a amplificação e detecção do ácido nucleico da *Mycobacterium tuberculosis*, elas apresentam algumas limitações. A técnica Xpert MTB/RIF necessita de fornecimento de energia estável – o que compromete sua portabilidade – e a LAMP foi avaliada somente com escarro, sem avaliação eficiente com outras amostras biológicas, como urina e sangue, e necessita de treinamento específico para sua utilização (SHETE *et al.*, 2019; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016). Portanto, essas técnicas moleculares de diagnóstico apresentam algumas limitações para uso em locais mais remotos, nos quais percebe-se a maior prevalência da doença.

Diante desse contexto, os biossensores se mostram como ferramentas promissoras para diagnóstico da tuberculose, visto que são plataformas rápidas, portáteis e precisas (ZHANG; MILLER, 2019).

1.2 Biossensores

Os biossensores consistem em dispositivos analíticos compostos por dois elementos principais: elemento de reconhecimento e transdutor. O primeiro é responsável pelo reconhecimento da molécula alvo. Alterações físico-químicas decorrentes do evento de reconhecimento são convertidas em um sinal mensurável pelo transdutor. (GUPTA; KAKKAR, 2018). O princípio de funcionamento de um biossensor pode ser observado na Figura 2.

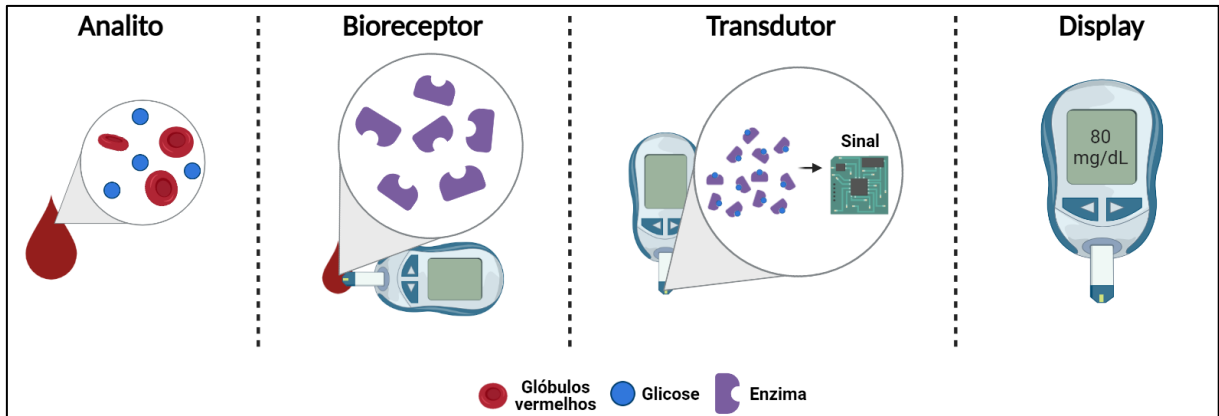


Figura 2 - Princípio de funcionamento de um biossensor e sua composição, exemplificado por um dispositivo para detecção de glicose (glicosímetro).

Fonte: Elaborado pelo autor (Biorender.com).

De acordo com o elemento de bioreconhecimento, os biossensores podem ser classificados em genossensores ou imunossensores, por exemplo, quando seus receptores consistem em moléculas de DNA ou anticorpos, respectivamente. Além disso, de acordo com o tipo de transdução, esses dispositivos podem ser classificados em sensores ópticos, eletroquímicos ou colorimétricos (ZHAO; JIANG, 2010; SABU *et al.*, 2019).

O mercado de biossensores foi estimado em 19,7 bilhões de dólares em 2020 e deve expandir para cerca de 29 bilhões de dólares até o final de 2027. Acredita-se que o mercado global de biossensores seja o que mais cresça até 2027, representando um patrimônio líquido de 33,7 bilhões de dólares. Entre os fatores que mais impulsionam o mercado de biossensores, temos o desenvolvimento de dispositivos miniaturizados para diagnósticos e procedimentos médicos (MARKET DATA FORECAST, 2022). Alguns exemplos incluem os dispositivos para detecção de glicose no sangue (como o glicosímetro) e os testes de gravidez, os quais impactam positivamente na vida das pessoas (BAHADIR; SEZGINTÜRK, 2015). Além disso, durante a pandemia da COVID-19, os biossensores receberam muita atenção devido a sua potencialidade em diagnósticos específicos, sendo alternativas para detecção e rastreamento rápido do vírus (TALEGHANI; TAGHIPOUR, 2021).

Diante das vantagens dos biossensores e da sua potencialidade em diagnósticos *point-of-care*, muitos dispositivos analíticos foram desenvolvidos para o diagnóstico da tuberculose.

1.3 Biossensores para diagnóstico da tuberculose

O alto número de casos de tuberculose, principalmente em regiões em desenvolvimento, reflete a necessidade de métodos de diagnósticos simples, baratos e sensíveis (SRIVASTAVA; VAN RIJN; JONGSMA, 2016). Sendo assim, diferentes biossensores foram estudados e

ganharam destaque para auxiliar no diagnóstico, entre os quais podemos citar os sensores eletroquímicos, ópticos, fluorescentes, mecânicos, colorimétricos e os magnéticos (SALIMIYAN RIZI *et al.*, 2020).

Os sensores eletroquímicos são os mais explorados para diagnóstico de TB (SALIMIYAN RIZI *et al.*, 2020), visto que apresentam alta especificidade, baixo custo, simplicidade na construção e portabilidade (HUANG *et al.*, 2017). Esses dispositivos se baseiam em parâmetros como corrente elétrica e condutância, por exemplo (GOLICHENARI *et al.*, 2019). Díaz-González, González-García e Costa-Garcia desenvolveram um imunossensor voltamétrico com eletrodos de carbono para detecção de antígenos da *Mycobacterium tuberculosis*. Esse dispositivo demonstrou um limite de detecção de 1 ng/mL (DÍAZ-GONZÁLEZ; GONZÁLEZ-GARCÍA; COSTA-GARCÍA, 2005).

Outra classe de sensores que ganha bastante destaque no diagnóstico de TB é a dos sensores ópticos (SALIMIYAN RIZI *et al.*, 2020). Há uma variedade de dispositivos ópticos usados na área médica, como os de ressonância plasmônica de superfície e bioluminescência, os quais se baseiam na geração de diferentes sinais ópticos dependendo da concentração do analito (PIRZADA; ALTINTAS, 2020). Hong *et al.* desenvolveram um imunensaio óptico de ressonância plasmônica de superfície para o antígeno CFP-10, o qual apresentou um limite de detecção de 100 ng/mL (HONG *et al.*, 2011).

Os sensores colorimétricos, apesar das suas limitações (como baixa sensibilidade), são alternativas rápidas e de fácil operação para detecção de TB. Tsai *et al.* desenvolveram um dispositivo baseado em papel com sondas de nanopartículas de ouro para detecção de tuberculose que apresentou um limite de detecção de $1,95 \times 10^{-2}$ ng/mL para sequências de DNA do patógeno. Apesar da alta sensibilidade, o dispositivo leva cerca de 1 hora para realizar as análises, além da etapa de extração do DNA (TSAI *et al.*, 2017).

Além dessas classes de dispositivos analíticos já desenvolvidos para diagnóstico da tuberculose, os biossensores baseados em papel se mostram alternativas vantajosas e atrativas para detecção de diferentes patógenos, incluindo a *Mycobacterium tuberculosis*.

1.4 Biossensores baseados em papel

Os biossensores baseados em papel são dispositivos analíticos alternativos de diagnóstico que utilizam o papel como substrato para detecção de analitos. Essas plataformas surgiram como ferramentas para o diagnóstico *point-of-care* uma vez que cumprem os critérios estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde para o desenvolvimento de testes de

diagnóstico, os quais incluem acessibilidade, sensibilidade, robustez, facilidade de uso, rapidez, entre outros (NGUYEN; KIM, 2020). Eles são explorados em diversas áreas, como alimentícia (HUA; LU, 2020) e médica. Como exemplo, temos os biossensores de papel do tipo *lateral flow* que ainda são fundamentais para o diagnóstico da COVID-19, fornecendo uma alternativa rápida para rastreamento das pessoas infectadas (LIU et al., 2021).

A utilização do papel para o desenvolvimento de dispositivos de diagnóstico apresenta diversas vantagens que garantem a sua viabilidade para testes *point-of-care*, entre as quais podemos citar: baixo custo de produção, fácil armazenamento, biocompatibilidade com diferentes amostras biológicas, possibilidade de funcionalização com diferentes biomoléculas e descarte fácil e seguro (por exemplo, por meio de incineração) (MARTINEZ *et al.*, 2010). Além disso, o papel, material feito de celulose ou de polímeros de celulose, permite que o fluido se mova apenas por ação capilar, sem necessidade de forças de bombeamento externas. A absorção da amostra dentro da matriz do papel é resultado da interação entre forças coesivas (por exemplo, tensão superficial) e forças adesivas (por exemplo, força de Van der Waals), as quais também auxiliam nas modificações nas camadas de bioreconhecimento. Diante disso, dispensa-se instrumentos robustos, como termocicladores, contribuindo ainda mais para a portabilidade desses dispositivos (YAMADA *et al.*, 2017; GONG; SINTON, 2017).

Os dispositivos baseados em papel vêm sendo utilizados, principalmente, em imunoenaios, no qual tem-se a detecção de analitos com base na reação imunológica antígeno-anticorpo. Os imunoenaios baseados em papel são constituídos, basicamente, de três componentes: 1) papel como substrato; 2) anticorpos ou proteínas como moléculas de reconhecimento; 3) materiais repórteres, por exemplo, nanopartículas de ouro, que podem atuar como sondas colorimétricas (LI *et al.*, 2019). Existem diversas leituras de sinais utilizadas nesses sensores baseados em papel, as quais envolvem eletroquímica e fluorescência, por exemplo. Entretanto, a leitura colorimétrica mostra-se vantajosa e atrativa, visto que a presença do analito é identificada por uma mudança na cor do papel, a qual pode ser identificada a olho nu, sem a necessidade de instrumentos, o que contribui para sua aplicação em ambientes com poucos recursos (NGUYEN; KIM, 2020).

Existem diferentes classes de biossensores baseados em papel, entre as quais temos como o exemplo mais utilizado os ensaios de fluxo lateral.

1.5 Ensaio de fluxo lateral

O ensaio de fluxo lateral (do inglês, *lateral flow assay* - LFA) é uma classe de biossensores baseados em papel que tem ganhado muita atenção devido a suas características favoráveis e compatíveis com as diretrizes da OMS referentes aos dispositivos de diagnóstico *point-of-care* (KASETSIRIKUL; SHIDDIKY; NGUYEN, 2020; QUESADA-GONZÁLEZ; MERKOÇI, 2015). O mercado de ensaios de fluxo lateral foi de, aproximadamente, 9 bilhões de dólares em 2022. Esse mercado está projetado para atingir até 11,2 bilhões de dólares em 2026, com uma taxa de crescimento anual de 6,1%. O crescimento desse mercado é impulsionado, principalmente, pela alta prevalência de doenças infecciosas (como COVID-19), aumento da comercialização de testes rápidos domiciliares e necessidade de testes rápidos, baratos e eficientes (RESEARCH AND MARKETS, 2022).

Os LFAs consistem em tiras de papel montadas em uma disposição e sequência específica e feitas com diferentes materiais sobre um suporte de sustentação, sendo fabricadas num formato de tira, normalmente com uma largura entre 4 e 6 mm e um comprimento de, aproximadamente, 7 cm (QUESADA-GONZÁLEZ; MERKOÇI, 2015). Um LFA tradicional é dividido em quatro partes: 1) região de amostra: onde a amostra é aplicada, geralmente sendo constituída de celulose ou fibra de vidro; 2) região de conjugação: geralmente constituída de fibras de vidro, é a zona onde encontra-se o bioconjugado (marcador, como uma nanopartícula, ligado a um bioreceptor, como DNA, anticorpo ou aptâmeros) responsável por capturar o analito; 3) região de detecção: consiste na área de teste e controle, normalmente feita de nitrocelulose, onde a linha de teste e controle estão impressas; 4) região absorvente: consiste na zona final, geralmente feita com o mesmo material que a região de amostra (como celulose), sendo responsável por absorver continuamente o fluido e não permitir que sofra refluxo que poderia gerar resultados falso-positivo (KASETSIRIKUL; SHIDDIKY; NGUYEN, 2020; BAHADIR; SEZGINTÜRK, 2016).

O funcionamento de um LFA é simples. Inicialmente, a amostra é aplicada na região de amostra e flui para a região de conjugação. Nessa região, caso a amostra contenha o analito, ele será capturado pelos seus bioreceptores ligados a transdutores (por exemplo, nanopartículas de ouro), o que resulta na primeira interação analito-receptor. O conjugado flui por força de capilaridade para a zona de detecção, passando pela linha de teste, onde os conjugados contendo o analito são capturados - indicando a presença do alvo -, e pela linha controle, onde os transdutores ligados aos bioreceptores são capturados - indicando o funcionamento do teste (QUESADA-GONZÁLEZ; MERKOÇI, 2015).

O princípio de funcionamento explicado representa o modelo mais utilizado em LFAs, chamado de modelo sanduíche, indicado para analitos grandes (>1 kDa), como proteínas, bactérias e células. Nessa estratégia, utiliza-se dois anticorpos monoclonais para epítomos diferentes ou um anticorpo monoclonal marcado e um anticorpo policlonal de captura. Além disso, em altas concentrações pode sofrer efeito gancho, na qual o analito satura todos os sítios de reconhecimento dos conjugados na zona de conjugação, porém, por estarem em excesso, fluem ao longo do dispositivo e se ligam nos bioreceptores da zona de amostra – impedindo a formação do sanduíche pelos conjugados com analitos. Além disso, esse modelo é mais propenso a fornecer resultados falso-positivos quando comparado com o segundo modelo, o competitivo. Tal modelo competitivo é mais útil para detecção de analitos pequenos (<1 kDa) e, como não sofrem o efeito gancho, é o mais indicado para amostra com altas concentrações de analitos. Nesse modelo, realiza-se a imobilização do analito na linha de teste. Portanto, como ocorre a competição pelo conjugado entre a proteína da amostra e a proteína presente na linha teste, espera-se que: em uma amostra negativa, o complexo tenha disponibilidade para se ligar na linha teste e, portanto, observa-se a formação da linha; para uma amostra positiva, ocorre a competição pelo analito e a linha de teste não é marcada ou é marcada numa intensidade menor, visto que os conjugados, total ou parcialmente, se ligam no analito da amostra e se tornam indisponíveis para se ligarem na linha teste (PAROLO *et al.*, 2020).

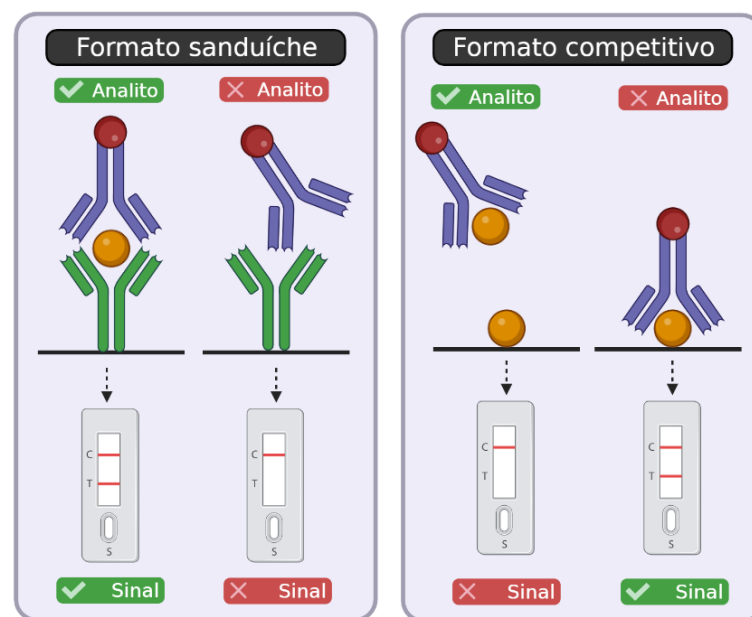


Figura 3 - Comparativo entre os modelos de detecção sanduíche e competitivo.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor (Biorender.com)

A escolha do bioreceptor adequado é um ponto muito importante para o desenvolvimento de LFAs específicos e sensíveis. O exemplo de LFA mais comum é o imunoenensaio de fluxo lateral, o qual utiliza anticorpos como bioreceptores e se baseia na reação imunológica antígeno-anticorpo (GUO *et al.*, 2021). Outras moléculas vêm sendo exploradas como receptores, por exemplo, os aptâmeros, que consistem em oligonucleotídeos artificiais que são baratos e que apresentam alta estabilidade; entretanto, sua atividade está intrinsecamente ligada com a força iônica e composição do tampão (PAROLO *et al.*, 2020; BAHADIR; SEZGINTÜRK, 2016).

Entre as várias formas de ler um sinal de um ensaio de fluxo lateral, a mais utilizada é a leitura óptica, visto que é simples (resultados podem ser visualizados por alterações visíveis a olho nu) e rápida (QUESADA-GONZÁLEZ; MERKOÇI, 2015). Diante disso, nanomateriais (materiais com tamanho entre 1 a 100 nm) são considerados marcadores ideais em ensaios de fluxo lateral, visto que apresentam uma alta área de superfície (grande espaço para funcionalização e modificações por diferentes moléculas e grupos funcionais) e propriedades elétricas, magnéticas, térmicas e ópticas únicas (GUO *et al.*, 2021). As nanopartículas de ouro (AuNPs) são os marcadores de detecção mais usados em LFAs, visto que apresentam diversas vantagens, como a ressonância plasmônica de superfície que produz uma coloração específica dependendo do tamanho da AuNPs, que pode ser visualizada a olho nu (método de detecção qualitativo). Além disso, podem ser sintetizadas em diferentes tamanhos e formas, apresentam baixa toxicidade, alta estabilidade e são facilmente funcionalizadas com receptores por adsorção física ou ligações covalentes (PAROLO *et al.*, 2020).

Portanto, diante da viabilidade como uma ferramenta *point-of-care*, os ensaios de fluxo lateral são utilizados para o diagnóstico de várias doenças por meio da detecção de diferentes biomarcadores.

1.6 Biomarcadores da tuberculose e sua potencialidade para uso em plataformas de diagnóstico rápido

Biomarcadores consistem em características objetivas e mensuráveis de processos biológicos, os quais podem ser normais, processos patogênicos ou respostas à intervenção farmacológica (STRIMBU; TAVEL, 2010). Como exemplo, podemos citar moléculas que têm sua expressão alterada em uma doença de maneira que seu monitoramento pode ser usado para detecção e tratamento de enfermidades. O biomarcador ideal é aquele que apresenta alta especificidade e sensibilidade, sendo detectado por procedimentos de amostragem

minimamente invasivos e sua concentração deve ser indicativa de um estado de doença (CORREIA *et al.*, 2017). Os biomarcadores da tuberculose consistem em moléculas encontradas em indivíduos infectados, as quais podem ser do próprio patógeno ou resultado da resposta imune do paciente. Tais moléculas podem ser usadas como alternativas de diagnósticos rápidos e eficientes frente às técnicas usadas atualmente (RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2020).

Os organismos respondem às condições ambientais por meio da regulação de proteínas de choque térmico (do inglês, *heat-shock proteins* - Hsps). Essas proteínas são classificadas em famílias de acordo com suas massas moleculares (MILANI; BASIRNEJAD; BOLHASSANI, 2019). As Hsps têm apresentado grande potencial como biomarcadores da tuberculose, visto que há um aumento em seus níveis em pacientes infectados quando comparados com pacientes saudáveis (SHEKHAWAT *et al.*, 2016). As Hsps realizam funções como termotolerância e degradação de proteínas, sendo que, na infecção tuberculosa, atuam desencadeando a resposta imune, fornecendo uma ligação entre a resposta imune inata e adaptativa (SHEKHAWAT *et al.*, 2014). A proteína Hsp65 é um exemplo dessa classe que pode ser usada no diagnóstico de tuberculose. Essa proteína de choque térmico é secretada pela bactéria *Mycobacterium tuberculosis* durante sua fase intracelular e desempenha um papel na patogênese da tuberculose, visto que induz respostas imunes celulares e humorais, além de que o nível dessa proteína pode aumentar em condições de estresse que ocorrem durante a infecção tuberculosa (SHEKHAWAT *et al.*, 2016; MUDALIAR *et al.*, 2006; SUBRAMANI *et al.*, 2017). Essa proteína, por exemplo, é um marcador para a tuberculose genital (SUBRAMANI *et al.*, 2017; PRASAD *et al.*, 2012) e para a meningite tuberculosa (MUDALIAR *et al.*, 2006), os quais são exemplos da forma extracelular da doença. Além disso, a Hsp65 já foi detectada em diferentes tipos de amostra, como soro e líquido cefalorraquidiano (SHEKHAWAT *et al.*, 2014). Testes baseados em PCR já foram desenvolvidos baseados no gene codificador da proteína Hsp65, os quais se mostraram como alternativas eficientes para detecção rápida de TB (MACENTE *et al.*, 2013). Entretanto, para realização do procedimento, é necessário extrair o DNA e utilizar equipamentos caros e robustos, como termocicladores, tornando uma alternativa cara, demorada e não aplicável em ambientes com poucos recursos.

A CFP-10 (proteína de filtrado de cultura de 10 kDa) é uma proteína secretada pela *Mycobacterium tuberculosis*, codificada pela região de diferença 1 (RD1) e responsável por induzir uma forte resposta imune celular (FENG *et al.*, 2011). Essa proteína é altamente expressa durante a fase de crescimento do patógeno e secretada ativamente pelas cepas de

bactérias (LIU *et al.*, 2017; MAEKURA *et al.*, 2019) A secreção dessa proteína ocorre precocemente e tal antígeno pode ser encontrado em fluidos de pacientes com tuberculose; logo, pode ser usado como marcador para a detecção precoce da infecção por tuberculose, sendo reconhecido como o antígeno mais abundante do MTB (KIM *et al.*, 2015; PHAN *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2019). A CFP-10 é vantajosa como biomarcadora por não estar presente na maioria das cepas de *Mycobacterium* não tuberculosas (HONG *et al.*, 2011). Além disso, esse antígeno é crucial para a virulência do patógeno, visto que a deleção dos genes responsáveis por sua codificação levou a uma redução da patogenicidade (RENSHAW *et al.*, 2005; POULAKIS *et al.*, 2016). Esse biomarcador já foi usado para detecção de tuberculose em amostras de sangue, escarro e urina (PHAN *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2019; WU *et al.*, 2017). Além disso, um imunoensaio bioeletrônico foi usado para detectar a concentração da CFP-10 em amostras clínicas diretas e não processadas de urina e soro e resultou numa faixa de concentração de 1,1 a 5,9 nM para essa proteína em amostras de soro, por exemplo (SEIFERT *et al.*, 2021).

Apesar desses biomarcadores poderem ser usados para diagnóstico da tuberculose, a detecção e monitoramento de analitos únicos pode ser uma fonte errônea de resultados, visto que falsos negativos ou falsos positivos podem ser obtidos pela inespecificidade. Diante disso, o desenvolvimento de biossensores de papel baseado em fluxo lateral para detecção simultânea das proteínas Hsp65 e CFP-10 usando sondas colorimétricas de AuNPs se mostra uma ferramenta inovadora, promissora e com uma proposta de maior especificidade para o diagnóstico *point-of-care*

2. Objetivos

2.1 Objetivos gerais

Desenvolver um dispositivo de imunoenensaio de fluxo lateral capaz de detectar os biomarcadores Hsp65 e CFP-10 de *Mycobacterium tuberculosis* de maneira específica e sensível, com base no modelo de ensaio competitivo; fornecendo, assim, uma ferramenta de diagnóstico *point-of-care* para o diagnóstico da tuberculose.

2.2 Objetivos específicos

Entre os objetivos específicos desse trabalho de conclusão de curso, temos:

- Funcionalizar as nanopartículas de ouro (AuNPs) com os anticorpos anti-Hsp65 e anti-CFP-10;
- Realizar a montagem do dispositivo de fluxo lateral a partir da organização de três regiões: zona de amostra; zona de detecção e zona absorvente;
- Realizar os testes de detecção, avaliando a sensibilidade – diferentes concentrações do analito – e a especificidade do biossensor – diferentes amostras;
- Avaliar o desempenho analítico do biossensor a partir da otimização de parâmetros experimentais, como bloqueio da zona de detecção, volume de conjugado e volume de amostra;
- Realizar análises quantitativas por meio de *softwares* de análises de fotos, como o ImageJ, para determinar a concentração dos analitos.

3. Materiais e métodos

3.1 Materiais

Os materiais utilizados foram o kit InnovaCoat® Gold 20 nm (Expedon - Inglaterra), anticorpos monoclonais anti-Hsp65 (MBS310272/MyBioSource), anticorpos monoclonais anti-CFP10 (MBS601269, My/BioSource), proteína Hsp65 (MBS806961/MyBiosource), proteína CFP-10/ESAT-6 (MBS505078, My/BioSource), anticorpo anti-mouse do tipo IgG, membrana de celulose, membrana de fibra de vidro, membrana de nitrocelulose, albumina do soro bovino (do inglês, *Bovine Sorum Albumin* - BSA), tampão fosfato-salino (do inglês, *Phosphate Buffered Saline* - PBS), tampão fosfato-salino com Tween-20 (do inglês, *Phosphate Buffered Saline with Tween 20* – PBST).

3.2 Métodos

3.2.1 Funcionalização das nanopartículas

Para a detecção do complexo CFP-10/ESAT-6 foram utilizados anticorpos monoclonais anti-CFP10 e para a detecção da Hsp65 foram utilizados anticorpos monoclonais anti-Hsp65. A funcionalização dos anticorpos com as nanopartículas de ouro (AuNPs) foi realizada utilizando o kit InnovaCoat® Gold 20 nm (Expedon – Inglaterra). Inicia-se o procedimento com a diluição do anticorpo com o diluente do kit, seguido da adição do tampão de reação. Após um tempo de reação, um tampão de parada é adicionado e a solução é submetida a centrifugação para separação dos anticorpos funcionalizados e resuspensão em solução com BSA para bloqueios dos sítios.

3.2.2 Montagem e modificação dos dispositivos

O dispositivo de fluxo lateral para a detecção dos dois biomarcadores foi fabricado em uma configuração de três camadas retangulares, formando três regiões específicas: 1) Zona de amostra (fibra de vidro); 2) Zona de detecção (nitrocelulose); 3) Zona absorvente (celulose). As três zonas, respectivamente, foram cortadas nas dimensões: 2,1 cm x 0,3 cm; 2,4 cm x 0,3 cm; 1,7 x 0,3 cm. No procedimento experimental, foi adotado a prévia incubação da suspensão nanopartículas de ouro funcionalizadas com anticorpos específicos para as proteínas com a amostra (tampão PBS fortificado com as proteínas) seguida da aplicação na zona de amostra. Logo, dispensou-se a utilização da zona de conjugação, onde a amostra, aplicada isoladamente, encontraria os conjugados previamente dispensados nessa membrana. Além disso, a zona de detecção foi modificada com as biomoléculas por meio de uma impressora de biomoléculas

para dispositivos de fluxo lateral. As linhas de testes foram modificadas com as proteínas CFP-10/ESAT-6 (linha de teste – LT1) e Hsp65 (linha de teste – LT2) nas concentrações, respectivamente, 1 mg/mL e 0,5 mg/mL. A fim de analisar se o dispositivo estava funcionando da maneira correta, também foi impressa a linha controle (LC), composta por anticorpos secundários que se ligam aos anticorpos de ratos do tipo IgG. O dispositivo montado e previamente modificado está representado na Figura 4.

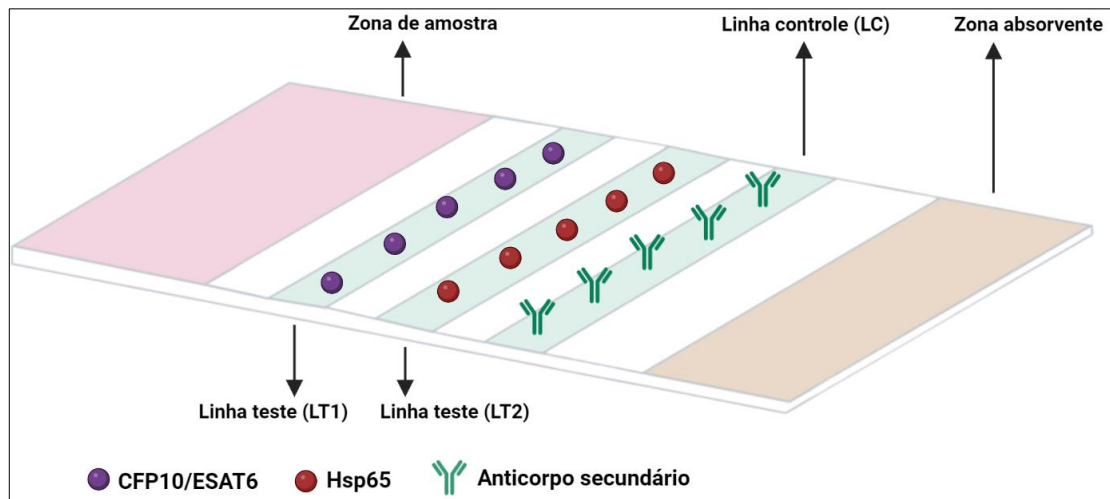


Figura 4 - Dispositivo completo, com as diferentes zonas e suas respectivas biomoléculas.
Fonte: Elaborado pelo próprio autor (Biorender.com)

3.2.3 Testes de detecção

O procedimento para realização dos testes para a detecção de ambas as proteínas consistiu na pré-incubação das nanopartículas funcionalizadas com lotes diferentes para a detecção dos dois biomarcadores com a amostra, como mostrado na Figura 5. Após o tempo de incubação, aplicou-se a amostra no dispositivo e capturou-se imagens das tiras após 15 min de corrida para as análises quantitativas. A amostra consistiu em uma solução de tampão PBS fortificado com as respectivas proteínas.

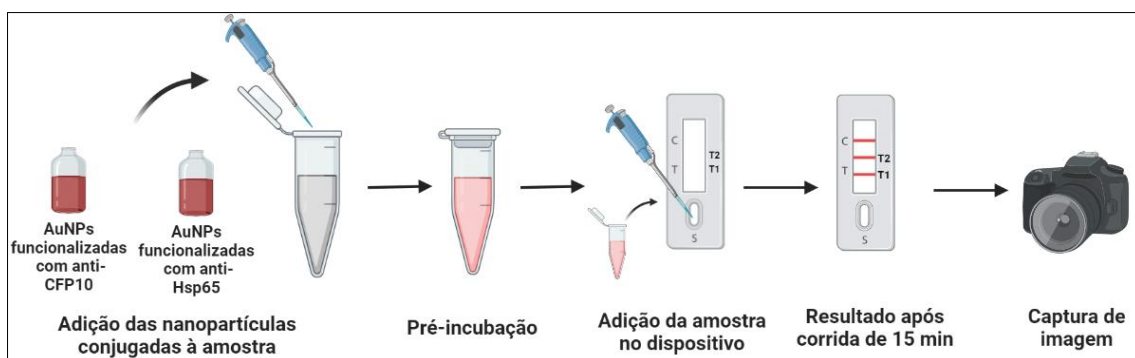


Figura 5 - Procedimento experimental para realização dos testes de detecção e otimização.
Fonte: Elaborado pelo próprio autor (Biorender.com).

Durante os testes de detecção, avaliou-se a seletividade e especificidade do dispositivo. É muito importante avaliar esses fatores, visto que o biossensor desenvolvido não deve gerar resultados falso positivos e ele deve ser capaz de detectar diferentes concentrações do antígeno. Diante disso, com o objetivo de avaliar a seletividade, os testes foram realizados com amostras contendo analito (amostras positivas) e somente aplicação de tampão sem a presença do analito (amostras negativas). Já em relação à sensibilidade, foram testadas diferentes concentrações do analito a fim de avaliar o limite de detecção dos biomarcadores. A Figura 6 ilustra o funcionamento do dispositivo. Na ausência do analito, os conjugados ficam disponíveis para se ligarem nos antígenos presentes nas linhas teste e, portanto, observa-se a marcação na membrana. Por outro lado, na presença dos analitos, os conjugados tornam-se indisponíveis para serem capturados pelos antígenos nas linhas teste e, então, observa-se a ausência ou redução da intensidade da linha teste.

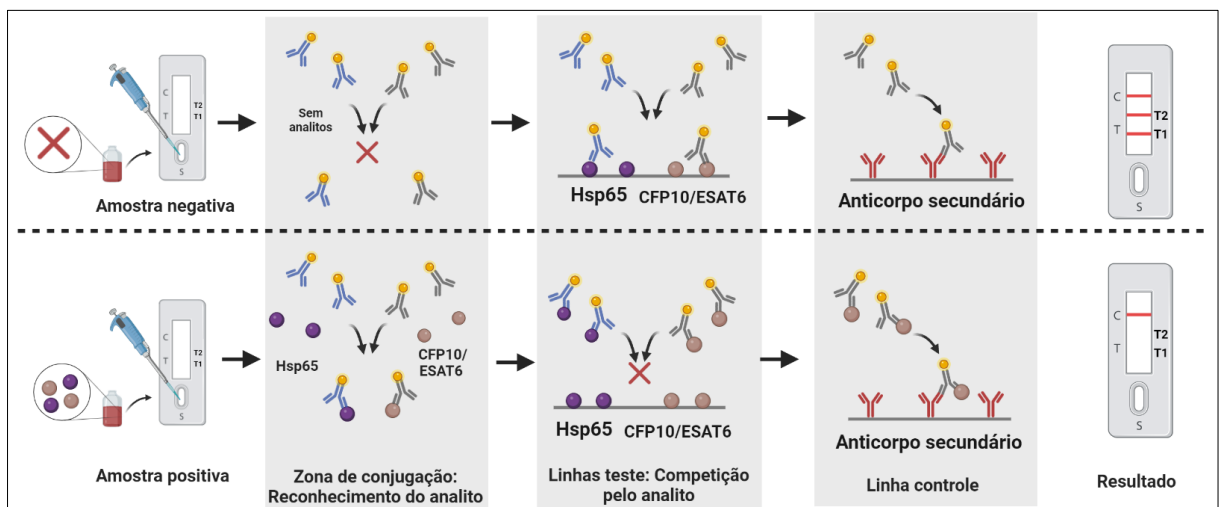


Figura 6 - Esquema da detecção colorimétrica do imunensaio.

Fonte: Elaborado pelo autor (Biorender.com).

3.2.4 Otimização dos parâmetros experimentais

Visando obter o melhor desempenho para o biossensor de fluxo lateral, realizou-se a otimização de alguns parâmetros experimentais. Entre os parâmetros, avaliou-se a influência do bloqueio da membrana de detecção, a sonicação do complexo proteico, o volume de conjugados incubados, o volume de amostra, o tampão de corrida e o tempo de incubação.

3.2.5 Análises quantitativas

A análise quantitativa foi realizada visando aprimorar os resultados qualitativos do ensaio de fluxo lateral. O procedimento de análise pode ser observado na Figura 7. Inicialmente, realizou-se a captura de imagens dos dispositivos após 15 min da aplicação da amostra por um *smartphone*. Em seguida, utilizando o *software* ImageJ, realizou-se a divisão da imagem nos canais RGB (do inglês, *Red, Green and Blue*) e utilizou-se o canal verde, o qual maximiza a sensibilidade da análise em ensaios que empregam rótulos vermelhos (como AuNPs). A partir do perfil do gráfico obtido, extraiu-se os valores da intensidade e calculou-se a intensidade da linha teste por meio de *softwares* de análises de dados, como o Prism e o OriginPro.

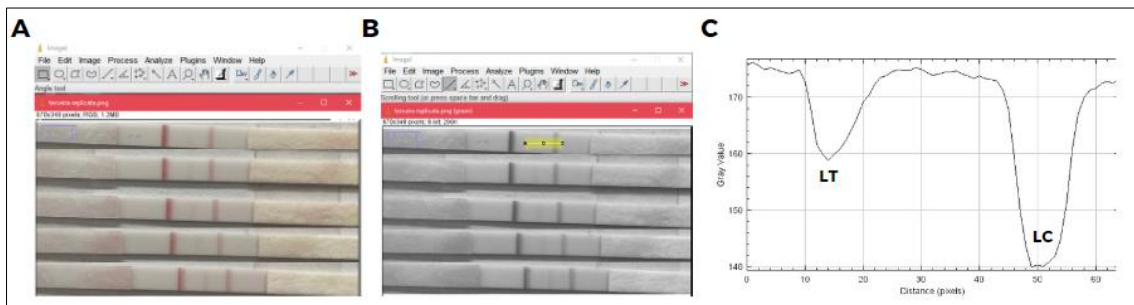


Figura 7 - Análise quantitativa usando o ImageJ. (A) Abertura do arquivo contendo a foto da(s) tira(s). (B) Divisão da imagem nos canais RGB, seleção do canal e demarcação da região a ser analisada. (C) Extração do perfil gráfico e dos valores de intensidades para aplicação em *softwares* de análise de dados.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

4. Resultados e discussão

4.1 Detecção isolada do complexo proteico CFP-10/ESAT-6 e Hsp65

Inicialmente, realizou-se testes para a determinação do limite de detecção das proteínas usando dispositivos modificados para a detecção isolada dos biomarcadores, o qual pode ser observado na Figura 8. Nesses testes iniciais, as modificações e montagem dos dispositivos foram realizadas manualmente, na qual as linhas de teste e controle foram pingadas na membrana nas proporções apresentadas em 3.2.2.

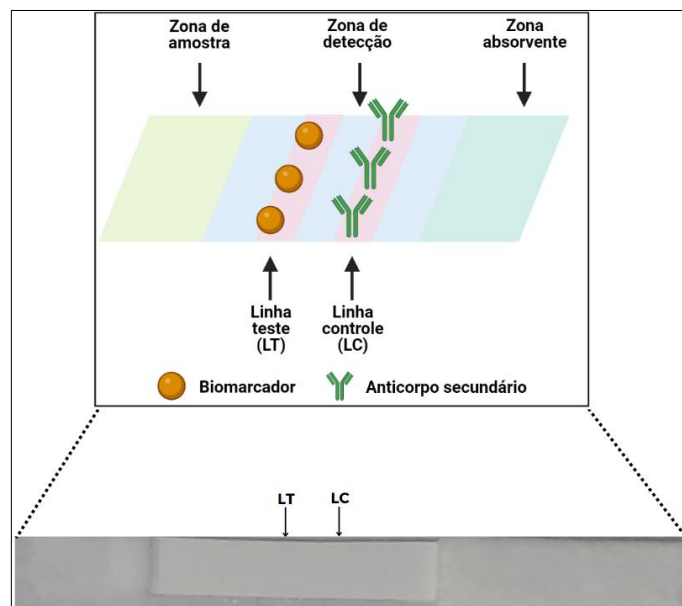


Figura 8 - Dispositivo projetado para a detecção individual dos biomarcadores.
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Para o complexo CFP-10/ESAT-6, incubou-se 25 μL da proteína em três concentrações diferentes (40 $\mu\text{g/mL}$, 60 $\mu\text{g/mL}$ e 80 $\mu\text{g/mL}$) com 5 μL de nanopartículas funcionalizadas com anti-CFP10 durante 5 min. Após 15 min de corrida, aplicou-se 15 μL de PBS para forçar o fluxo de nanopartículas adsorvidas na zona de amostra. O resultado após 25 min de corrida pode ser observado na Figura 9, na qual percebe-se que houve uma diferença significativa na intensidade de marcação da LT, revelando a detecção do biomarcador nessas concentrações a partir da faixa de concentração de 40 $\mu\text{g/mL}$.

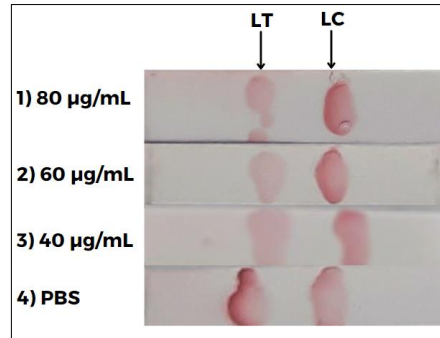


Figura 9 - Testes iniciais para a detecção de CFP-10, sendo LT a linha de teste composta pela CFP-10/ESAT-6 e a LC a linha controle.

Aplicou-se o mesmo procedimento citado acima para a detecção da Hsp65. O resultado após 25 min de corrida pode ser observado na Figura 10, na qual observa-se que houve uma diminuição significativa da intensidade da linha teste conforme aumentou-se a concentração da proteína, resultado esperado para o modelo competitivo de detecção. Além disso, percebe-se que houve uma leve marcação da linha teste na concentração de 40 µg/mL; ou seja, a detecção de tal biomarcador se tornou mais sensível a partir dessa concentração.

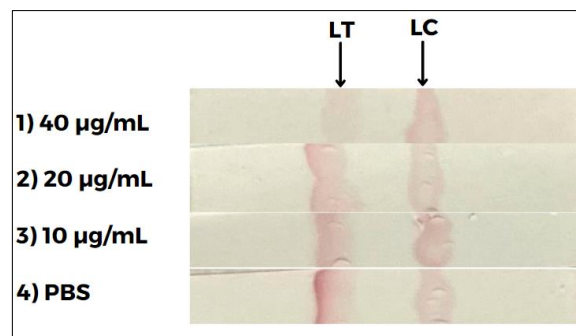


Figura 10 - Testes iniciais para a detecção da Hsp65, sendo LT a linha de teste composta pela Hsp65 e a LC a linha controle.

4.2 Testes de detecção: CFP-10 e Hsp65

Após a determinação do limite de detecção das proteínas de maneira individual, iniciou-se os testes para detecção usando o dispositivo modificado para detecção simultânea. Os testes de detecção foram conduzidos inicialmente avaliando os biomarcadores separadamente, utilizando a concentração de 40 µg/mL para o complexo CFP-10/ESAT-6 e para a proteína Hsp65. Para isso, incubou-se 20 µL da amostra contendo um dos biomarcadores durante 5 min com 10 µL de AuNPs funcionalizadas com os respectivos anticorpos (5 µL de cada um dos conjugados) e aplicou-se na zona de amostra. Após 5 min de corrida, aplicou-se 15 µL de PBS para que nanopartículas remanescentes pudessem chegar à zona absorvente – procedimento

padrão utilizado em todos os testes. O resultado, após 25 min de corrida, pode ser observado na Figura 11.

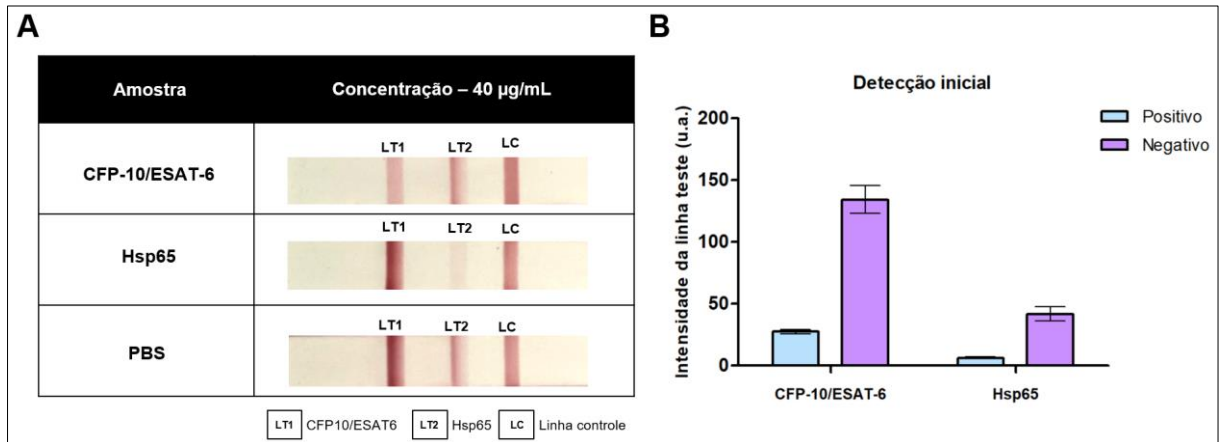


Figura 11 - (A) Tiras após 25 min de corrida das amostras contendo as proteínas na concentração de 40 µg/mL. (B) Detecção quantitativa da intensidade das linhas testes.

Nas três amostras testadas, observou-se uma corrida homogênea e rápida, visto que levou cerca de 4 min para o fluxo atingir a zona absorvente do dispositivo. Como pode ser observado na amostra negativa (PBS), ambas as linhas testes ficaram nitidamente marcadas, que é o esperado no modelo competitivo, visto que as nanopartículas conjugadas com os anticorpos ficaram disponíveis para se ligarem nas proteínas das linhas. Para a detecção da CFP-10/ESAT-6, apesar de se observar a marcação da linha de teste (LT1), houve uma diminuição significativa da intensidade, que é corroborada com a análise quantitativa (Figura 11B). A diminuição da intensidade indica que a maior parte dos conjugados se ligaram nas proteínas presentes na amostra e os conjugados restantes se ligaram a LT1, mostrando que o dispositivo foi capaz de detectar as proteínas alvo. O mesmo resultado foi observado para os testes de detecção da HSP65. Comparado com a amostra negativa, a aplicação da amostra positiva resultou na diminuição da intensidade da LT2, que mostra que o dispositivo foi capaz de detectar essa proteína. Além disso, observou-se a marcação da LC em todos os testes, que mostra que o dispositivo funcionou corretamente, visto que os conjugados foram capturados pelos anticorpos dessa região.

Apesar do dispositivo ter apresentado o resultado esperado para o modelo competitivo, foi realizada a otimização de alguns parâmetros experimentais a fim de obter um melhor desempenho analítico, por exemplo, observar a total diminuição da intensidade para a detecção da CFP-10/ESAT-6.

4.3 Testes de otimização

Para aprimorar o desempenho analítico do dispositivo, alguns parâmetros experimentais são cruciais para otimização, por exemplo, o bloqueio dos sítios ativos da zona de detecção, volume de amostra, volume de conjugado e o tempo de incubação.

4.3.1 Bloqueio da membrana

Um dos parâmetros que pode influenciar o funcionamento de um dispositivo de fluxo lateral é o bloqueio dos sítios ativos da membrana que compõe a zona de detecção, pois interações inespecíficas entre os biomarcadores presentes na amostra e a membrana podem ocorrer durante o fluxo da amostra, resultando em falso positivo ou falso negativo. Para isso, realizou-se testes com o bloqueio da membrana utilizando 100 μ L de BSA 1% em PBS durante 5 min, seguida de lavagem tripla com 1 mL de PBS. Após o bloqueio dos sítios ativos, realizou-se os testes de detecção nas mesmas condições da detecção inicial: incubação prévia de 20 μ L de amostra com 10 μ L de conjugados durante 5 min, com aplicação adicional de PBS após 5 min de corrida. Os resultados após 20 min de corrida podem ser observados na Figura 12.

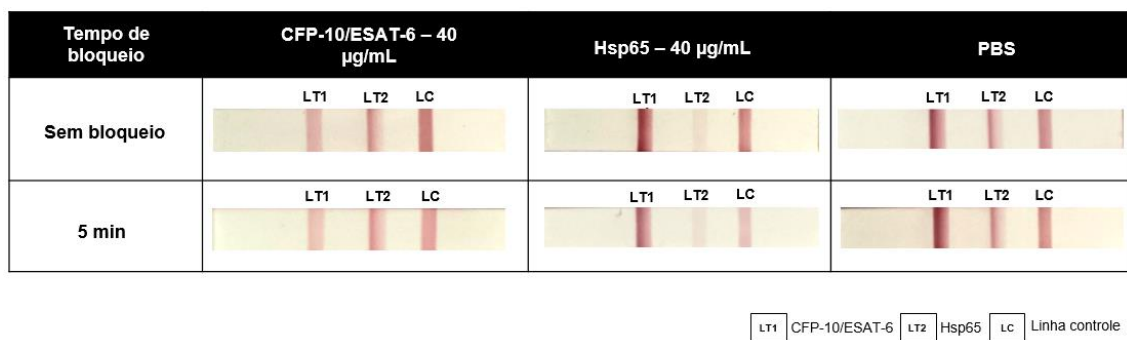


Figura 12 - Teste de bloqueio dos sítios ativos da tira. Detecção da CFP-10/ESAT-6, Hsp65 e controle negativo para tiras sem etapa de bloqueio e com bloqueio de 5 min usando BSA.

Em todos os testes com as diferentes amostras, o dispositivo apresentou um fluxo homogêneo e rápido, com cerca de 4 min de corrida até a amostra atingir a zona absorvente. O bloqueio dos sítios ativos, apesar de ser importante para o desempenho analítico do dispositivo, não se mostrou crucial nos resultados observados. Como pode ser observado, não houve uma diferença significativa da intensidade da linha teste entre as tiras sem bloqueio e as com bloqueio para as três amostras testadas. Entretanto, observou-se que nas tiras sem o bloqueio dos sítios ativos, há deposição das nanopartículas de ouro remanescentes na membrana após 30 min de aplicação da amostra. Esse depósito resulta numa marcação vermelha da membrana que, em análises quantitativas, pode atuar como um ruído de fundo e comprometer a análise

quantitativa. Uma vez que o bloqueio não influenciou no desempenho analítico, os experimentos subsequentes foram realizados com tiras sem bloqueio e com as fotos capturadas após 15 min de corrida para evitar a influência do ruído nas análises.

4.3.2 Sonicação do complexo CFP-10/ESAT-6

Nos testes iniciais para detecção do complexo CFP-10/ESAT-6 observou-se a marcação da LT1 para as amostras positivas, embora a intensidade tenha sido inferior que a obtida para as amostras negativas. Uma das hipóteses para esse comportamento era a de que o anticorpo monoclonal anti-CFP10 usado na funcionalização com as AuNPs não estaria reconhecendo seu epítipo específico. Isso poderia ocorrer caso o epítipo estivesse no interior das estruturas helicoidais que formam o heterodímero 1:1 com a proteína ESAT-6. Ambas as proteínas, CFP-10 e ESAT-6, apresentam uma natureza hidrofóbica e, para manter sua solubilidade em água, escondem alguns resíduos hidrofóbicos dentro da estrutura que as ligam (DE JONGE *et al.*, 2007). Visando expor tais regiões, que poderiam conter o epítipo, realizou-se a sonicação do complexo CFP-10/ESAT-6 durante 5 min. Após a sonicação, aplicou-se a amostra nas mesmas condições realizadas e otimizadas anteriormente. O resultado (Figura 13) mostra que não houve uma diferença significativa entre as intensidades da amostra sonicada e sem sonicar. Portanto, a realização desse procedimento não resultou na exposição de possíveis epítipos escondidos e nem contribuiu para a melhora no desempenho analítico para a detecção da CFP-10.

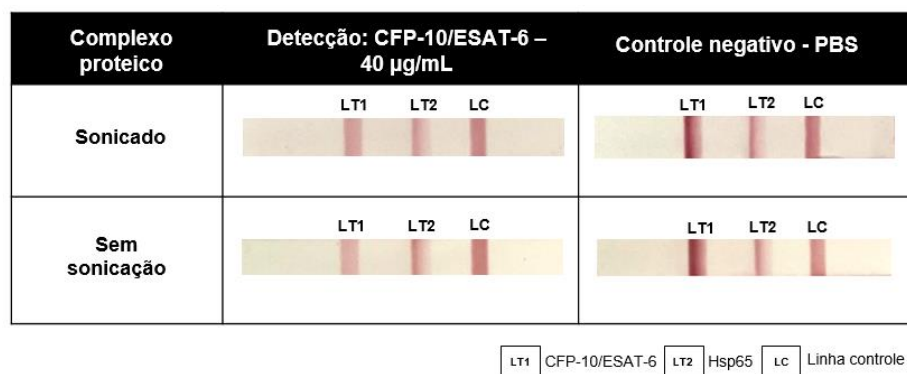


Figura 13 - Teste de sonicação do complexo proteico. Detecção da CFP-10/ESAT-6 e controle negativo, com o complexo proteico sonicado durante 5 min e sem sonicação.

4.3.3 Volume de conjugado

Nos testes anteriores, observou-se um excesso de nanopartículas na zona absorvente que poderiam influenciar as análises quantitativas, uma vez que o volume do conjugado

(nanopartículas + anticorpos) é um parâmetro importante nos modelos competitivos. Em alta concentração, os conjugados capturam a proteína alvo disponível na amostra, no entanto, por estar em excesso, parte fica disponível para se ligar nas proteínas da linha teste, resultando na marcação da linha e em falso negativo.

Diante disso, realizou-se o teste de otimização do conjugado visando diminuir a intensidade das linhas testes na amostra positiva. Para isso, realizou-se testes com o conjugado concentrado – como feito nos testes iniciais – e com o conjugado diluído, nos parâmetros mostrados na Tabela 1. Os resultados após 25 min de corrida podem ser observados na Figura 14.

Tabela 1 - Parâmetros utilizados para o teste de otimização do volume de conjugado.

Testes	Parâmetros			
	Volume de conjugado	PBS	Tempo de incubação	Concentração da proteína
Diluído	2,5 µL de cada	5 µL	5 min	40 µg/mL
Concentrado	5 µL de cada	-	5 min	40 µg/mL

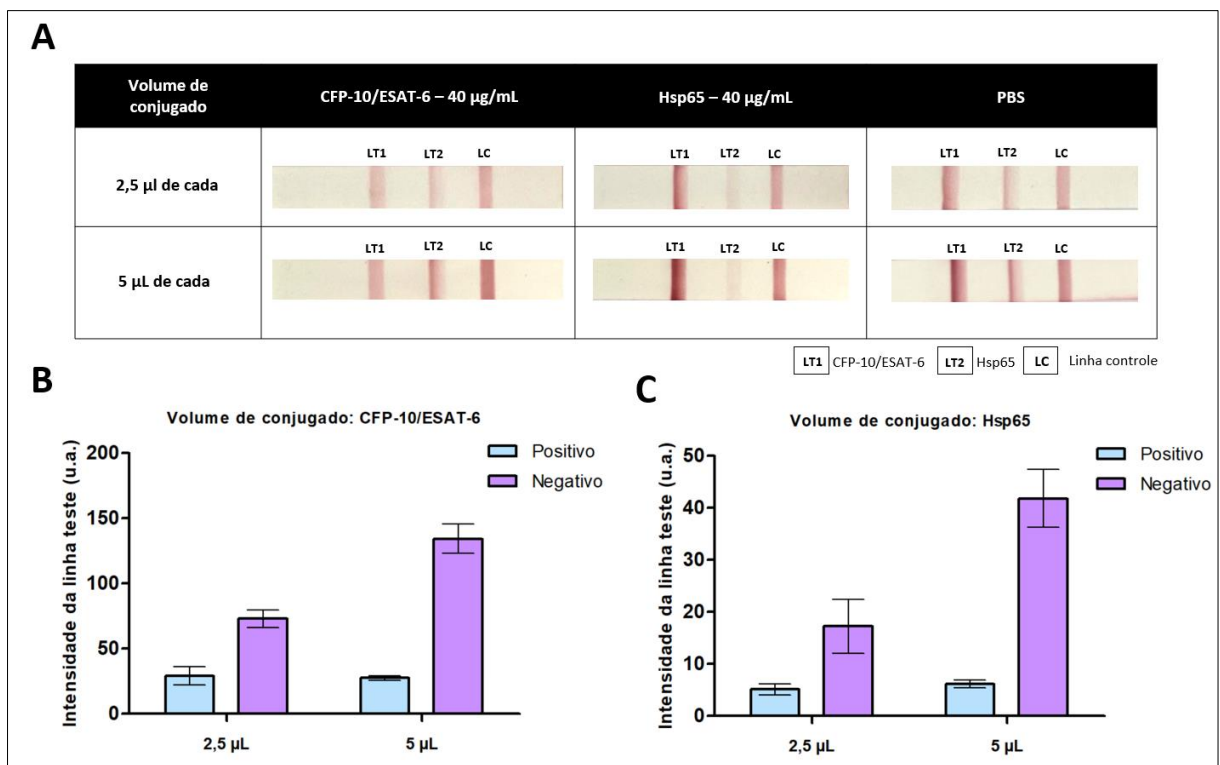


Figura 14 - Otimização do volume de conjugado. (A) Detecção da CFP-10/ESAT-6, da Hsp65 e controle negativo, testando 5 µL de conjugados (2,5 µL de cada um dos conjugados) e 10 µL de conjugados (5 µL de cada um dos conjugados). (B) Detecção quantitativa da CFP-10/ESAT-6. (C) Detecção quantitativa da Hsp65.

Em todos os testes, as linhas controles ficaram nitidamente marcadas, revelando que, mesmo em um volume de conjugado menor, o dispositivo continuou funcionando. Em relação à detecção dos biomarcadores, os resultados foram consistentes. Tanto na detecção da CFP-10/ESAT-6 quanto na da Hsp65, percebe-se que não houve uma mudança significativa na intensidade da linha teste. Logo, a otimização do volume do conjugado não influenciou na detecção das proteínas diretamente. Entretanto, além do desempenho do biossensor, otimizar o volume de conjugado é importante para o custo final do dispositivo, ou seja, diminuir o volume implica em diminuir o custo. Portanto, para os experimentos seguintes, foram utilizados 2,5 μL de conjugado para cada um dos biomarcadores, visto que a diferença de intensidade das linhas teste entre as amostras negativa e positivas continuou significativa.

4.3.4 Volume de amostra

Apesar do resultado positivo em relação ao volume de conjugado, outro parâmetro extremamente importante é o volume de amostra, visto que, quanto maior o volume, maior será a quantidade de analito para saturar os sítios de reconhecimento dos conjugados e resultar em um diagnóstico mais sensível. Diante disso, realizou-se testes visando otimizar o volume de amostra, seguindo as condições apresentadas na Tabela 2. Os resultados após 25 min de corrida, para volume final de 30 μL , podem ser observados na Figura 15.

Tabela 2 - Parâmetros utilizados para o teste de otimização do volume de amostra.

Otimização do volume de amostra					
Testes	Parâmetros				
	Volume de amostra	Volume de conjugado	Tampão PBS	Tempo de incubação	Concentração da proteína
Menor volume	20 μL	2,5 μL de cada	5 μL	5 min	40 $\mu\text{g/mL}$
Maior volume	25 μL	2,5 μL de cada	-	5 min	40 $\mu\text{g/mL}$

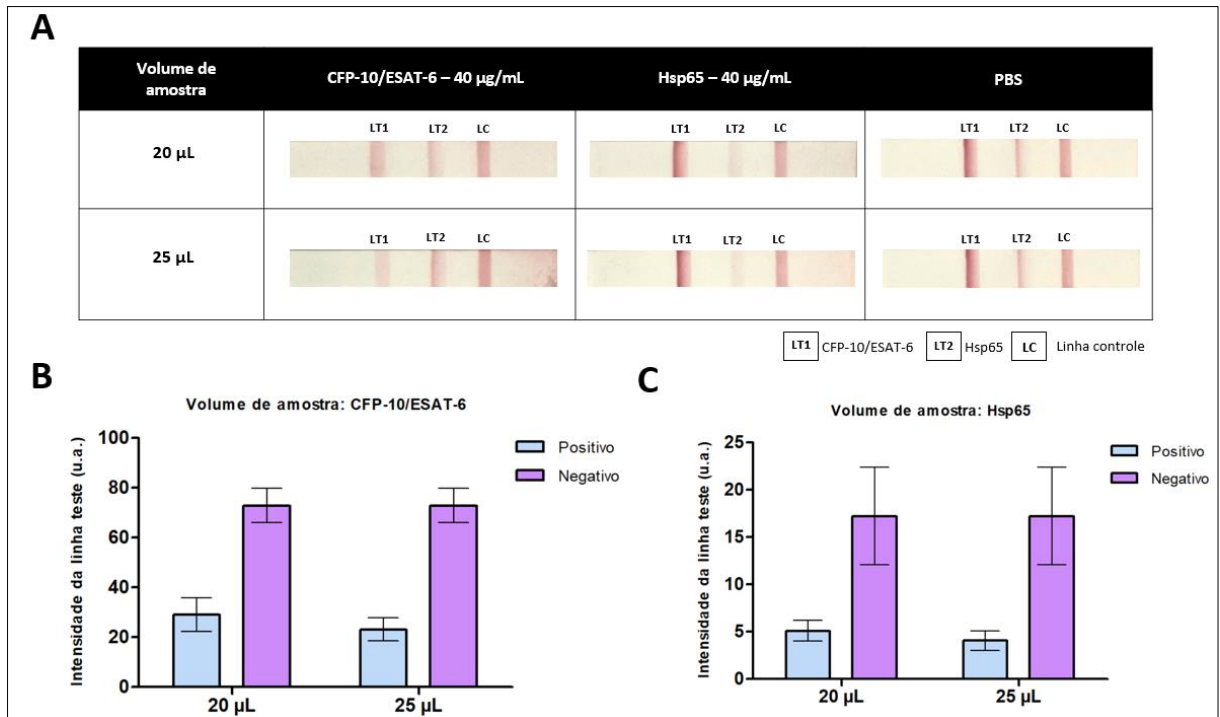


Figura 15 - Otimização do volume de amostra. (A) Detecção da CFP-10/ESAT-6, Hsp65 e controle negativo, com volume de amostra de 20 µL e 25 µL. (B) Detecção quantitativa da CFP-10/ESAT-6. (C) Detecção quantitativa da Hsp65.

Uma das formas de interpretar o resultado quantitativo do biossensor é analisar a razão S/N (do inglês, *Signal/Noise* – Sinal/Ruído), parâmetro de grande importância que indica a qualidade de uma medida analítica. Nesse caso, o sinal se refere a medida da amostra com o analito, enquanto o ruído consiste nas variações do sinal na ausência do alvo. Tratando-se do modelo competitivo de detecção, na ausência do analito espera-se uma forte marcação da LT, referente ao ruído. Por outro lado, na amostra positiva, espera-se que o sinal seja o mais baixo possível devido à baixa intensidade das LT. Diante disso, quanto menor o S/N melhor é o desempenho analítico do dispositivo.

Sendo assim, como pode ser observado na figura 15A, a detecção do complexo CFP-10/ESAT-6 utilizando um volume maior de amostra apresentou uma diminuição da intensidade da LT1, assim como do S/N de 0,40 para 0,32. Logo, aumentar o volume de amostra levou à saturação de AuNPs conjugadas que antes ficavam disponíveis para se ligar no alvo na LT1. Já em relação à detecção da Hsp65, em ambos os volumes de amostra, a detecção se mostrou sensível, visto que se observa uma diferença significativa entre as amostras negativa e positiva. Uma redução no S/N de 0,30 para 0,23 ocorreu com o aumento do volume de amostra. Portanto, foi escolhido o volume de 25 µL de amostra para os seguintes testes de otimização.

4.3.5 Tampão de corrida

Em um ensaio de fluxo lateral, o fluxo da amostra é muito importante para o desempenho analítico do dispositivo. Um dos fatores que pode influenciar no fluxo da amostra e contribuir para a melhora dos resultados é o tipo de tampão de corrida. Além da utilização do PBS, é possível utilizar outros tampões, como o PBS-Tween20 (PBST), o qual, como possui um detergente em sua formulação, pode facilitar o fluxo da amostra ao longo do dispositivo. A fim de analisar o efeito do tampão de corrida utilizado para forçar o fluxo, foram realizados testes com dois tampões, PBS e PBST, adicionados após 5 min de corrida. O resultado pode ser observado na Figura 16.

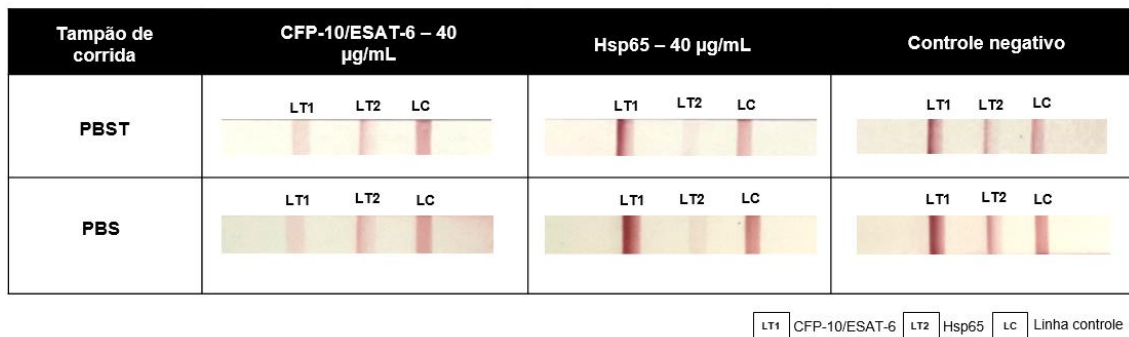


Figura 16 - Otimização do tampão de corrida. Detecção da CFP-10/ESAT-6, Hsp65 e controle negativo, com a utilização do PBS-Tween20 (PBST) e PBS.

O fluxo da amostra e as intensidades das linhas teste foram semelhantes entre os dois tampões testados. Portanto, o uso do tampão PBST, não resultou em uma melhora significativa no desempenho analítico do dispositivo. Dessa forma, a aplicação adicional de PBS foi mantida para os testes posteriores.

4.3.6 Tempo de incubação

A partir dos resultados obtidos, percebeu-se que a detecção da CPF10/ESAT6 apresentou menor sensibilidade que a da Hsp65. Diante disso, levantou-se a hipótese de que o tempo de incubação poderia não ser suficiente para que o complexo proteico interagisse com todas as AuNPs funcionalizadas, de modo a saturar todos os sítios possíveis e evitar que os conjugados se ligassem na linha teste. Sendo assim, foram realizados testes variando o tempo de incubação da amostra com os conjugados: sem incubação prévia, incubação por 5 min e incubação por 10 min. A Figura 17 apresenta os resultados das corridas após 25 min.

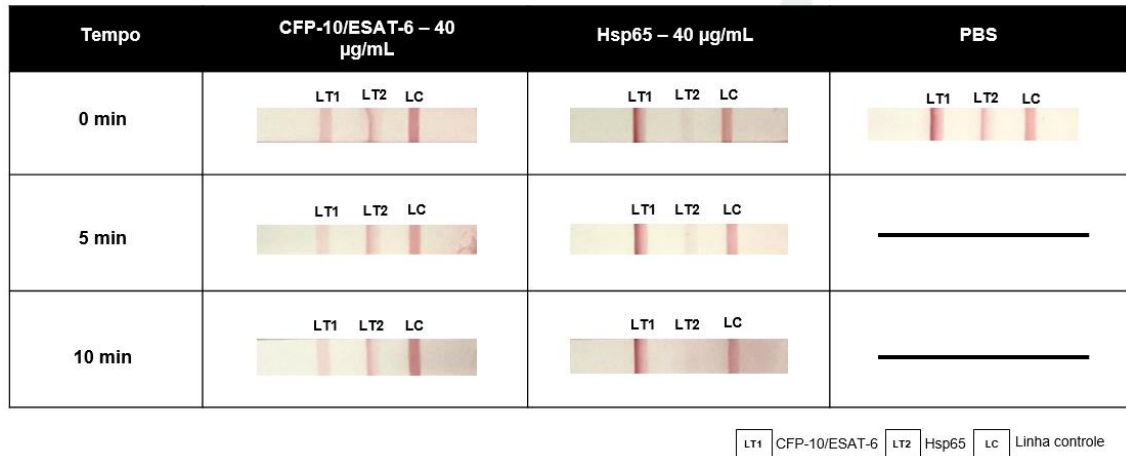


Figura 17 - Otimização do tempo de incubação. Detecção da CFP-10/ESAT-6, Hsp65 e controle negativo, sem tempo de incubação e com tempo de 5 e 10 min.

Para ambos os biomarcadores, observa-se uma diferença na intensidade da linha teste entre os experimentos realizados com as amostras sem incubação e os testes com incubação prévia. Esse resultado revela que, apesar da detecção acontecer, não realizar a incubação da proteína resulta numa menor interação das proteínas com os conjugados e, conseqüentemente, em uma maior intensidade da LT. Apesar disso, não houve uma diferença relevante entre as incubações por 5 e 10 min. Portanto, visando tornar o diagnóstico mais rápido, adotou-se o tempo de incubação de 5 min.

4.4 Construção das curvas analíticas

Após otimização do dispositivo, construiu-se as curvas analíticas para cada um dos biomarcadores, a fim de oferecer um método de diagnóstico quantitativo. Para isso, foram capturadas fotos dos dispositivos e a intensidade das linhas testes foram analisadas utilizando o software ImageJ. A curva da intensidade em função da concentração do analito foi construída utilizando o software OriginPro.

4.4.1 Curva analítica: CFP-10/ESAT-6

Para a construção da curva analítica do complexo CFP-10/ESAT-6, foram testadas 5 concentrações diferentes: 2,5 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL e 40 µg/mL. As fotos capturadas após 15 min de corrida e a curva analítica obtida estão apresentadas na Figura 18.

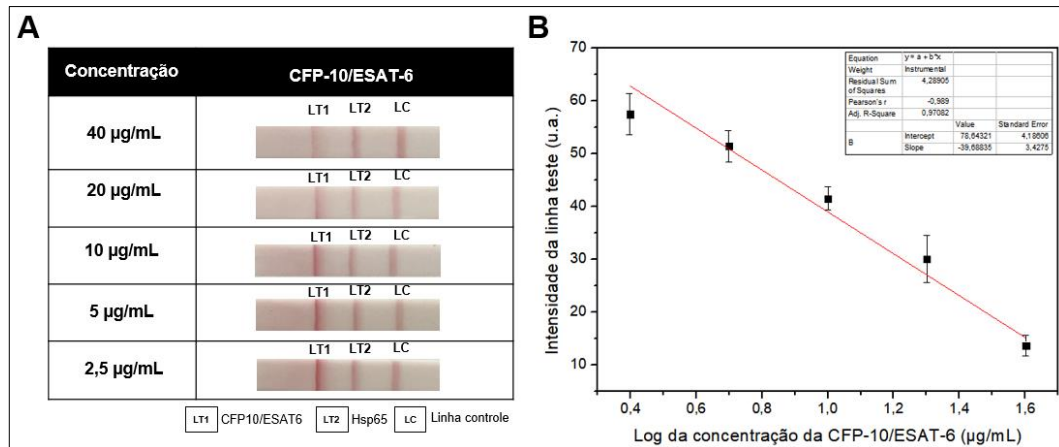


Figura 18 - Detecção da CFP-10/ESAT-6 com variação da concentração. (B) Curva analítica para a detecção da CFP-10/ESAT-6 ($R^2=0,971$).

Observa-se que as intensidades das linhas de teste diminuíram conforme aumentou-se a concentração do analito, comportamento esperado para o modelo competitivo do ensaio de fluxo lateral. Uma relação linear foi obtida entre a intensidade da linha de teste e o logaritmo da concentração do complexo, com uma curva analítica com ajuste (R^2) de 0,971.

4.4.2 Curva analítica: Hsp65

Para a construção da curva analítica da detecção da Hsp65, também se utilizou as concentrações 2,5 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL e 40 µg/mL. Assim como na construção da curva analítica da CFP-10/ESAT-6, as imagens foram capturadas após 15 min de corrida e podem ser observadas na Figura 19, assim como a curva analítica resultante.

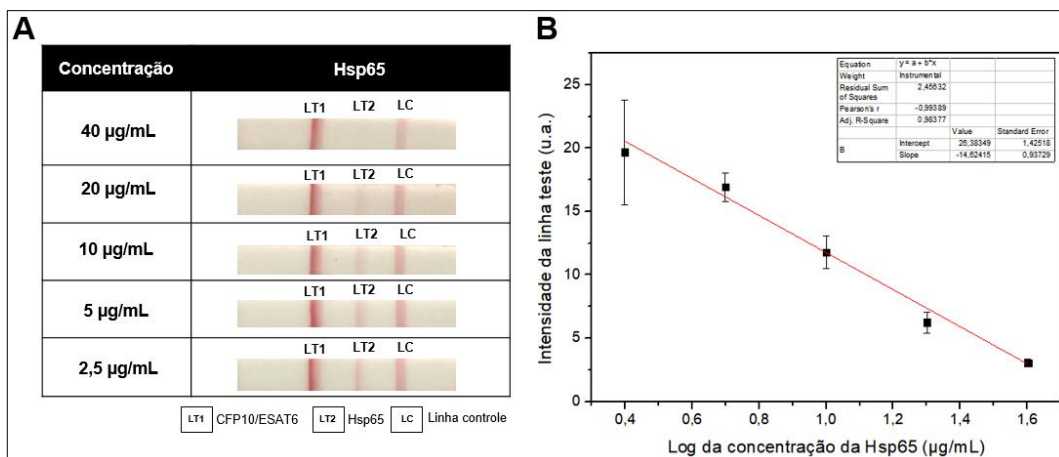


Figura 19 - Detecção da Hsp65 com variação da concentração. (B) Curva analítica para a detecção da Hsp65 ($R^2=0,984$).

Analisando as intensidades obtidas, observa-se que as linhas de teste diminuíram de intensidade conforme aumentou-se a concentração. Uma relação linear entre a intensidade e o logaritmo da concentração do analito foi obtida, gerando uma curva analítica com um ótimo ajuste (R^2) de 0,984.

5. Conclusões e perspectivas

O dispositivo desenvolvido nesse projeto apresentou resultados promissores para a detecção simultânea dos biomarcadores da tuberculose pelo ensaio de fluxo lateral competitivo. Entre os parâmetros testados, o dispositivo apresentou melhor desempenho analítico com a incubação de 5 min da amostra com 2,5 μL de cada um dos conjugados, sem a etapa de bloqueio dos sítios ativos da membrana. Além disso, percebeu-se a melhora no fluxo com 30 μL de aplicação, seguida da aplicação de 15 μL de tampão PBS para forçar o fluxo de biomoléculas adsorvidas ao longo das membranas. As curvas analíticas, apresentaram ótimos ajustes com R^2 de 0,971 e 0,984 para CFP-10/ESAT-6 e Hsp65, respectivamente, o que mostra a potencialidade do dispositivo para análises quantitativas de tais biomarcadores. Além disso, em etapas seguintes, torna-se necessário avaliar o desempenho analítico do dispositivo com amostras reais, como o soro, assim como o estudar a especificidade frente a outras amostras proteicas. Ademais, o dispositivo se mostra uma potencial e inovadora ferramenta para o diagnóstico *point-of-care* da tuberculose, visto que a análise simultânea de dois biomarcadores traz maior especificidade ao teste e sua aplicação necessita de pouca infraestrutura laboratorial, facilitando a aplicação em regiões periféricas.

6. Referências bibliográficas

- ACHARYA, Bodhraj et al. Advances in diagnosis of Tuberculosis: an update into molecular diagnosis of Mycobacterium tuberculosis. **Molecular biology reports**, v. 47, n. 5, p. 4065-4075, 2020.
- ALLAHYARTORKAMAN, M. et al. Low diagnostic accuracy of Xpert MTB/RIF assay for extrapulmonary tuberculosis: A multicenter surveillance. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–6, 2019.
- BAHADIR, E. B.; SEZGINTÜRK, M. K. Applications of commercial biosensors in clinical, food, environmental, and biothreat/biowarfare analyses. **Analytical Biochemistry**, v. 478, p. 107–120, 2015.
- BAHADIR, E. B.; SEZGINTÜRK, M. K. Lateral flow assays: Principles, designs and labels. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 82, p. 286–306, 2016.
- Biosensors Market Analysis. Disponível em: <https://www.marketdataforecast.com/market-reports/biosensors-market>. Acesso em: 20 maio 2022.
- CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Tuberculosis (TB)**. 2018. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/tb/>>. Acesso em: 21 jun. 2022.
- CORREIA, Carolina N. et al. Circulating microRNAs as potential biomarkers of infectious disease. **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 118, 2017.
- DE JONGE, Marien I. et al. ESAT-6 from Mycobacterium tuberculosis dissociates from its putative chaperone CFP-10 under acidic conditions and exhibits membrane-lysing activity. **Journal of bacteriology**, v. 189, n. 16, p. 6028-6034, 2007.
- DÍAZ-GONZÁLEZ, M.; GONZÁLEZ-GARCÍA, M. B.; COSTA-GARCÍA, A. Immunosensor for Mycobacterium tuberculosis on screen-printed carbon electrodes. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 20, n. 10 SPEC. ISS., p. 2035–2043, 2005.
- FENG, T. T. et al. Novel monoclonal antibodies to ESAT-6 and CFP-10 antigens for ELISA-based diagnosis of pleural tuberculosis. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 15, n. 6, p. 804–810, 2011.
- FURIN, J.; COX, H.; PAI, M. Tuberculosis. **The Lancet**, v. 393, n. 10181, p. 1642–1656, 2019.

- GOLICHENARI, B. et al. Electrochemical-based biosensors for detection of *Mycobacterium tuberculosis* and tuberculosis biomarkers. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 39, n. 8, p. 1056–1077, 2019.
- GONG, M. M.; SINTON, D. Turning the Page: Advancing Paper-Based Microfluidics for Broad Diagnostic Application. **Chemical Reviews**, v. 117, n. 12, p. 8447–8480, 2017.
- GUO, J. et al. Nanomaterial Labels in Lateral Flow Immunoassays for Point-of-Care-Testing. **Journal of Materials Science and Technology**, v. 60, p. 90–104, 2021.
- GUPTA, Shagun; KAKKAR, Vipin. Recent technological advancements in tuberculosis diagnostics—A review. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 115, p. 14-29, 2018.
- HAN, Seung Beom et al. The impact of the Xpert MTB/RIF screening among hospitalized patients with pneumonia on timely isolation of patients with pulmonary tuberculosis. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1-9, 2021.
- HONG, S. C. et al. Clinical immunosensing of tuberculosis CFP-10 in patient urine by surface plasmon resonance spectroscopy. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 160, n. 1, p. 1434–1438, 2011.
- HONG, S. C. et al. Ultrasensitive immunosensing of tuberculosis CFP-10 based on SPR spectroscopy. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 156, n. 1, p. 271–275, 2011.
- HUA, M. Z.; LU, X. Development of a Microfluidic Paper-Based Immunoassay for Rapid Detection of Allergic Protein in Foods. **ACS Sensors**, v. 5, n. 12, p. 4048–4056, 2020.
- HUANG, Y. et al. Disease-related detection with electrochemical biosensors: A review. **Sensors (Switzerland)**, v. 17, n. 10, p. 1–30, 2017.
- KASETSIRIKUL, S.; SHIDDIKY, M. J. A.; NGUYEN, N. T. Challenges and perspectives in the development of paper-based lateral flow assays. **Microfluidics and Nanofluidics**, v. 24, n. 2, p. 1–18, 2020.
- KHAWBUNG, Jessy Lallungawi; NATH, Durbba; CHAKRABORTY, Supriyo. Drug resistant tuberculosis: a review. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 74, p. 101574, 2021.

KIM, J. et al. Clinical immunosensing of tuberculosis CFP-10 antigen in urine using interferometric optical fiber array. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 216, p. 184–191, 2015.

LI, F. et al. Paper-based point-of-care immunoassays: Recent advances and emerging trends. **Biotechnology Advances**, v. 39, n. August 2019, 2020.

LI, J. et al. Click DNA cycling in combination with gold nanoparticles loaded with quadruplex DNA motifs enable sensitive electrochemical quantitation of the tuberculosis-associated biomarker CFP-10 in sputum. **Microchimica Acta**, v. 186, n. 9, 2019.

LIU, C. et al. Quantification of circulating Mycobacterium tuberculosis antigen peptides allows rapid diagnosis of active disease and treatment monitoring. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 15, p. 3969–3974, 2017.

LIU, D. et al. Nanozyme chemiluminescence paper test for rapid and sensitive detection of SARS-CoV-2 antigen. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 173, n. September 2020, 2021.

MACENTE, S. et al. Evaluation of hsp65 nested PCR-restriction analysis (PRA) for diagnosing tuberculosis in a high burden country. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.

MAEKURA, R. et al. Serum antibody profiles in individuals with latent Mycobacterium tuberculosis infection. **Microbiology and Immunology**, v. 63, n. 3–4, p. 130–138, 2019.

MARTINEZ, A. W. et al. Diagnostics for the developing world: Microfluidic paper-based analytical devices. **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 1, p. 3–10, 2010.

MILANI, A.; BASIRNEJAD, M.; BOLHASSANI, A. Heat-shock proteins in diagnosis and treatment: An overview of different biochemical and immunological functions. **Immunotherapy**, v. 11, n. 3, p. 215–239, 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Boletim Epidemiológico Especial. Tuberculose 2022. p. 39, 2022.

MUDALIAR, A. V. et al. Detection of 65 kD heat shock protein in cerebrospinal fluid of tuberculous meningitis patients. **BMC Neurology**, v. 6, p. 1–7, 2006.

NGUYEN, Q. H.; KIM, M. IL. Nanomaterial-mediated paper-based biosensors for colorimetric pathogen detection. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 132, p. 116038, 2020.

- NIKAM, C. et al. Rapid Diagnosis of Mycobacterium tuberculosis with Truenat MTB: A Near-Care Approach. *PLoS ONE*, v. 8, n. 1, p. 1–8, 2013.
- PAROLO, C. et al. Tutorial: design and fabrication of nanoparticle-based lateral-flow immunoassays. *Nature Protocols*, v. 15, n. 12, p. 3788–3816, 2020.
- PHAN, L. M. T. et al. Gold-copper nanoshell dot-blot immunoassay for naked-eye sensitive detection of tuberculosis specific CFP-10 antigen. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 121, n. August, p. 111–117, 2018.
- PIRZADA, M.; ALTINTAS, Z. Recent progress in optical sensors for biomedical diagnostics. *Micromachines*, v. 11, n. 4, 2020.
- POULAKIS, N. et al. Intracellular ESAT-6: A new biomarker for Mycobacterium tuberculosis infection. *Cytometry Part B - Clinical Cytometry*, v. 90, n. 3, p. 312–314, 2016.
- PRASAD, S. et al. Targeted detection of 65 kDa heat shock protein gene in endometrial biopsies for reliable diagnosis of genital tuberculosis. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, v. 160, n. 2, p. 215–218, 2012.
- QUESADA-GONZÁLEZ, D.; MERKOÇI, A. Nanoparticle-based lateral flow biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 73, p. 47–63, 2015.
- RENSHAW, P. S. et al. Structure and function of the complex formed by the tuberculosis virulence factors CFP-10 and ESAT-6. *EMBO Journal*, v. 24, n. 14, p. 2491–2498, 2005.
- Research and Markets. 2022. Disponível em: <https://www.researchandmarkets.com/reports/4805627/lateral-flow-assays-global-market-trajectory>. Acesso em: 25 maio 2022.
- RICKS, S. et al. The potential impact of urine-LAM diagnostics on tuberculosis incidence and mortality: A modelling analysis. *PLoS Medicine*, v. 17, n. 12, p. 1–20, 2020.
- RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, E. et al. Application of antigenic biomarkers for Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Zhejiang University: Science B*, v. 21, n. 11, p. 856–870, 2020.
- SABU, Chinnu et al. Advanced biosensors for glucose and insulin. *Biosensors And Bioelectronics*, [S.L.], v. 141, p. 111201-111201, 2019.

- SAKTIAWATI, Antonia MI et al. Diagnosis of tuberculosis through breath test: a systematic review. **EBioMedicine**, v. 46, p. 202-214, 2019.
- SALIMIYAN RIZI, K. et al. The overview and perspectives of biosensors and Mycobacterium tuberculosis: A systematic review. **Journal of Cellular Physiology**, v. 236, n. 3, p. 1730–1750, 2020.
- SHEKHAWAT, S. D. et al. Evaluation of host Hsp(s) as potential biomarkers for the diagnosis of tuberculous meningitis. **Clinical Neurology and Neurosurgery**, v. 140, p. 47–51, 2016.
- SHEKHAWAT, S. D. et al. Heat shock proteins: Possible biomarkers in pulmonary and extrapulmonary tuberculosis. **Human Immunology**, v. 75, n. 2, p. 151–158, 2014.
- SHETE, Priya B. et al. Diagnostic accuracy of TB-LAMP for pulmonary tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. **BMC infectious diseases**, v. 19, n. 1, p. 1-11, 2019.
- SRIVASTAVA, S. K.; VAN RIJN, C. J. M.; JONGSMA, M. A. Biosensor-based detection of tuberculosis. **RSC Advances**, v. 6, n. 22, p. 17759–17771, 2016.
- STRIMBU, Kyle; TAVEL, Jorge A. What are biomarkers?. **Current Opinion in HIV and AIDS**, v. 5, n. 6, p. 463, 2010.
- SUBRAMANI, E. et al. Mycobacterial heat shock protein 65 mediated metabolic shift in decidualization of human endometrial stromal cells. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2017.
- SULIS, Giorgia et al. Recent developments in the diagnosis and management of tuberculosis. **NPJ primary care respiratory medicine**, v. 26, n. 1, p. 1-8, 2016.
- TALEGHANI, N.; TAGHIPOUR, F. Diagnosis of COVID-19 for controlling the pandemic: A review of the state-of-the-art. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 174, p. 112830, 2021.
- TSAI, T. T. et al. Diagnosis of Tuberculosis Using Colorimetric Gold Nanoparticles on a Paper-Based Analytical Device. **ACS Sensors**, v. 2, n. 9, p. 1345–1354, 2017.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global tuberculosis report 2020**. 2020.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global tuberculosis report 2020**. 2020.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global tuberculosis report 2021**. 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. The use of loop-mediated isothermal amplification (TB-LAMP) of the diagnosis of pulmonary tuberculosis. 2016.

WU, X. et al. Preparation of immunochromatographic strips for rapid detection of early secreted protein ESAT-6 and culture filtrate protein CFP-10 from *Mycobacterium tuberculosis*. **Medicine (United States)**, v. 96, n. 51, p. 4–9, 2017.

YAMADA, K. et al. Toward practical application of paper-based microfluidics for medical diagnostics: state-of-the-art and challenges. **Lab on a Chip**, v. 17, n. 7, p. 1206–1249, 2017.

ZHANG, Hanyuan; MILLER, Benjamin L.. Immunosensor-based label-free and multiplex detection of influenza viruses: state of the art. **Biosensors And Bioelectronics**, v. 141, p. 111476-111476, 2019.

ZHAO, Z.; JIANG, H. Enzyme-based Electrochemical Biosensors. **Biosensors**, n. February, p. 1–23, 2010.