

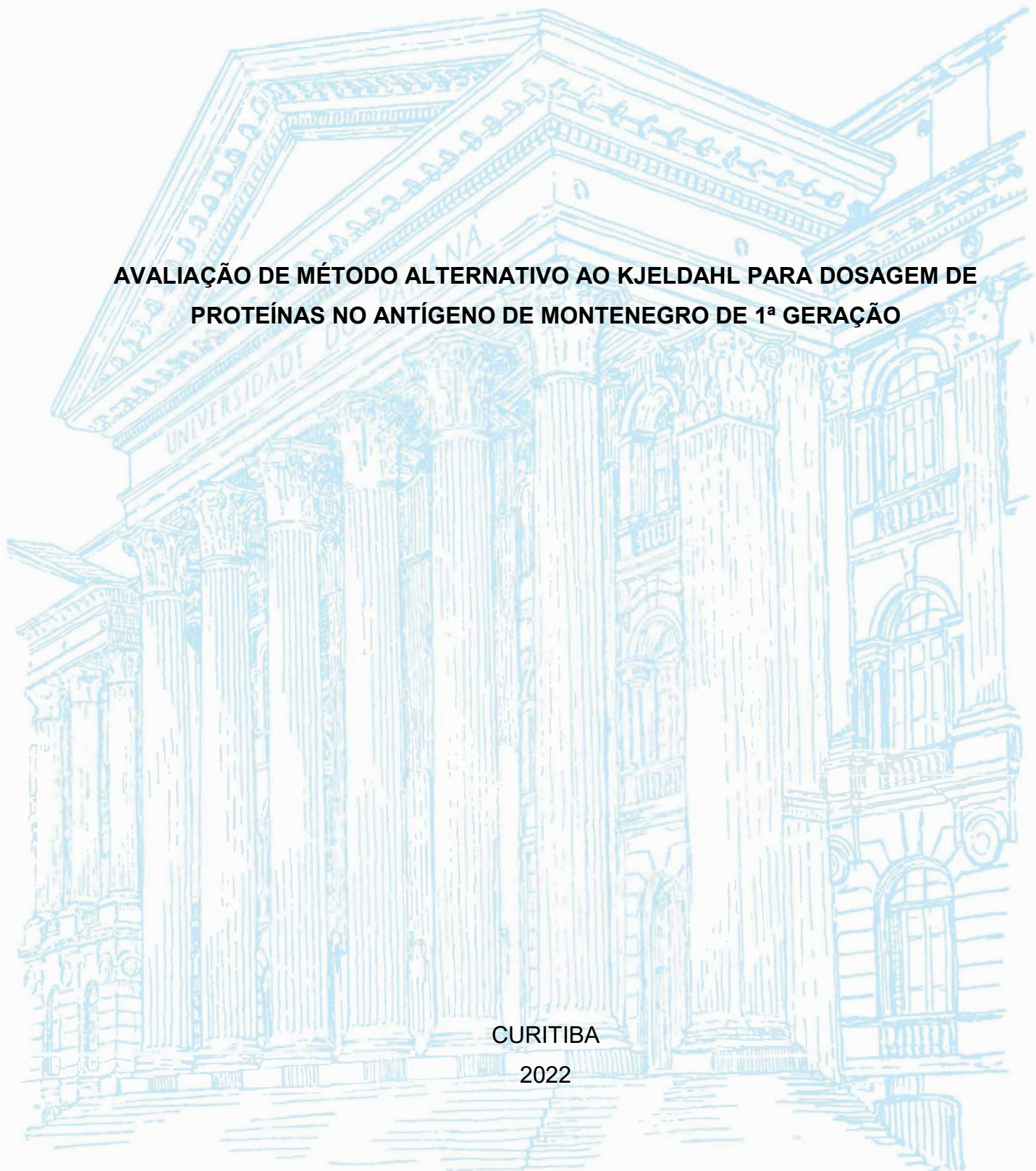
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JOYCE KAORI FUJISAWA

**AVALIAÇÃO DE MÉTODO ALTERNATIVO AO KJELDAHL PARA DOSAGEM DE  
PROTEÍNAS NO ANTÍGENO DE MONTENEGRO DE 1ª GERAÇÃO**

CURITIBA

2022



JOYCE KAORI FUJISAWA

AVALIAÇÃO DE MÉTODO ALTERNATIVO AO KJELDAHL PARA DOSAGEM DE  
PROTEÍNAS NO ANTÍGENO DE MONTENEGRO DE 1ª GERAÇÃO

Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Farmácia, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Farmácia Generalista.

Orientadora: Profa. Dra. Dayane Alberton

CURITIBA

2022



## RESUMO

A leishmaniose é uma doença tropical negligenciada causada pelo protozoário do gênero *Leishmania* transmitido através da picada das fêmeas de flebotomíneos. De acordo com as manifestações clínicas, as leishmanioses se dividem em tegumentar (LT), caracterizada por lesões que acometem pele e mucosas, e visceral (LV), que acomete as vísceras. Dentre os testes para o diagnóstico da LT, destaca-se a Intradermorreação de Montenegro (IDRM). Esse teste apresenta vantagens como alta sensibilidade e especificidade diagnósticas, facilidade na execução e baixo custo, e, devido a essas características, a IDRM apresenta elevada demanda em regiões endêmicas. O Antígeno de Montenegro é o medicamento utilizado para induzir a resposta de hipersensibilidade tardia do teste e o Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos (CPPI), no Paraná, é um dos fabricantes desse reagente. Um dos desafios para a produção do Antígeno de Montenegro é quantificar com maior exatidão e precisão as proteínas da solução antigênica, visto que a quantidade de proteínas injetadas determina a intensidade da resposta imunológica. O método clássico empregado para dosagem de proteínas é o método de Kjeldahl, que dosa o nitrogênio total em uma amostra. No entanto, esse método apresenta alta imprecisão analítica, não é específico, pois quantifica nitrogênio não proteico, emprega solventes corrosivos, grande volume de amostra e é demorado. Diante disso, o objetivo do trabalho foi testar outros métodos para a quantificação de proteínas na solução de Antígeno de Montenegro, que possam substituir o método de Kjeldahl. Para tanto, os métodos testados foram semi-micro determinação de Kjeldahl, fluorométrico e os colorimétricos Biureto e Bradford. Os métodos colorimétricos não apresentaram sensibilidade para detectar as proteínas na solução. Pelo método semi-micro de Kjeldahl foi quantificado aproximadamente 22 µg/mL de proteínas e, conforme já esperado, o método apresentou uma alta imprecisão analítica para repetibilidade, pois o desvio-padrão relativo (DPR), obtido da sextuplicata de amostras analisadas, foi aproximadamente 29%. Além disso, mesmo sendo uma semi-microdeterminação, o volume de amostra requerida foi 40 mL. O método fluorométrico, por outro lado, quantificou 27 µg/mL de proteínas e apresentou uma baixa imprecisão analítica para a repetibilidade de 2,6%. Outras vantagens inerentes ao método fluorométrico empregado foram o baixo volume de amostra requerido (20 µL) e, a execução simples e rápida do protocolo. Portanto, o método fluorométrico pode ser empregado para quantificar as proteínas do Antígeno de Montenegro.

Palavras-chave: Leishmaniose. Antígeno de Montenegro. Proteínas. Kjeldahl. Fluorimetria.

## ABSTRACT

*Leishmaniasis is a neglected tropical disease caused by protozoa of the genus Leishmania transmitted through the bite of female sandflies. According to the clinical manifestations, leishmaniasis is divided into tegumentary (LT), characterized by lesions that affect the skin and mucous membranes, and visceral (LV), which affects the viscera (LV). Among the tests for the diagnosis of LT, the Montenegro Skin Test (MST) stands out. This test has advantages such as high diagnostic sensitivity and specificity, ease of execution and low cost, and, due to these characteristics, MST is in high demand in endemic regions. The Montenegro Antigen is the drug used to induce the late hypersensitivity response of the test, and the Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos (CPPI), in Paraná, is one of the manufacturers of this reagent. One of the challenges for the production of the Montenegro Antigen is to quantify the proteins in the antigenic solution with greater accuracy and precision, since the amount of injected proteins determines the intensity of the immune response. The classic method used to measure proteins is the Kjeldahl method, which measures the total nitrogen in a sample. However, this method has high analytical imprecision, is not specific, as it quantifies non-protein nitrogen, uses corrosive solvents, large sample volume and is time-consuming. Therefore, the objective of this work was to test other methods for the quantification of proteins in the Montenegro Antigen solution, which can replace the Kjeldahl method. For this purpose, the methods tested were semi-micro determination of Kjeldahl, fluorometric and colorimetric Biuret and Bradford. Colorimetric methods were not sensitive to detect proteins in the solution. By the Kjeldahl semi-micro method, approximately 22 µg/mL of proteins were quantified and, as expected, the method presented a high analytical imprecision for repeatability, since the relative standard deviation (RSD) obtained from the sextuplicate of analyzed samples was approximately 29 %. Furthermore, even though it was a semi-microdetermination, the sample volume required was 40 mL. The fluorometric method, on the other hand, quantified 27 µg/mL of proteins and presented a low analytical inaccuracy for repeatability of 2.6%. Other advantages inherent to the fluorometric method used were the low sample volume used (20µL) and the simple and quick execution of the protocol. Therefore, the fluorometric method can be employed to quantify the Montenegro Antigen proteins.*

Keywords: Leishmaniasis. Montenegro Antigen. Proteins. Kjeldahl. Fluorimetry.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo biológico e de transmissão de <i>Leishmania</i> .....	20
Figura 2 - Diagnóstico da leishmaniose tegumentar cutânea .....	23
Figura 3 - Delimitação da área ao redor do eritema decorrente do teste de intradermorreação de Montenegro .....	25
Figura 4 - Antígeno de Montenegro produzido pelo CPPI para uso exclusivo para pesquisa em animais .....	28
Figura 5 - Digestor DK 20 <i>Digestion Unit</i> e destilador automático com titulador UDK 159 <i>Automatic Kjeldahl Analyzer</i> , respectivamente .....	32
Figura 6 - Equipamento Qubit Fluorometer 1.0 .....	33

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - Curva de calibração dos padrões 1, 2 e 3 do Qubit Protein Assay Kits, com linha de tendência .....	36
---	----

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Nitrogênio total quantificado em solução de Antígeno de Montenegro ...	34
Tabela 2 - Resultado de leitura dos padrões .....	36
Tabela 3 - Resultado de proteínas totais em $\mu\text{g/mL}$ .....	37

## LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

DTN	- Doenças tropicais negligenciadas
OMS	- Organização Mundial da Saúde
LT	- Leishmaniose tegumentar
IDRM	- Intradermorreação de Montenegro
CPPI	- Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos
ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
OMS	- Organização Mundial da Saúde
LTA	- Leishmaniose tegumentar americana
LC	- Leishmaniose cutânea
LM	- Leishmaniose mucosa
LV	- Leishmaniose visceral
PCR	- Reação em cadeia da polimerase
ELISA	- Ensaio de imunoabsorção enzimática
TDR	- Programa Especial de Pesquisa e Treinamento em Doenças Tropicais
BCA	- Ácido Bicinconínico
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
RNA	-Ácido ribonucleico
UV	-Ultravioleta
TECPAR	-Instituto de Tecnologia do Paraná
UFPR	-Universidade Federal do Paraná
DP	-Desvio Padrão
DPR	-Desvio padrão relativo
AOAC	-Association of Official Analytical Chemists

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
1.1 JUSTIFICATIVA .....	17
1.2 OBJETIVOS .....	18
1.2.1 Objetivo geral .....	18
1.2.2 Objetivos específicos .....	18
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>19</b>
2.1 LEISHMANIOSES .....	19
2.1.1 Leishmaniose tegumentar americana (LTA) .....	20
2.2 DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE .....	22
2.2.1 Teste de Intradermorreação de Montenegro .....	25
2.3 MÉTODOS DE DOSAGEM DE PROTEÍNAS .....	28
2.3.1 Método de Kjeldahl .....	29
2.3.2 Método por fluorimetria .....	30
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>31</b>
3.1 AMOSTRAS .....	31
3.2 MÉTODO DE KJELDAHL (SEMI-MICRO DETERMINAÇÃO) .....	31
3.3 FLUORIMETRIA .....	32
3.4 REPETIBILIDADE .....	33
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>34</b>
4.1 MÉTODO DE KJELDAHL (SEMI-MICRO DETERMINAÇÃO) .....	34
4.2 FLUORIMETRIA .....	35
<b>5 CONCLUSÕES</b> .....	<b>38</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>39</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As doenças tropicais negligenciadas (DTN) são um grupo de doenças endêmicas encontradas especialmente entre as populações pobres da África, Ásia e América Latina e causam entre 500 mil e 1 milhão de óbitos anualmente (BVSMS, 2022). Dentre as 20 DTNs reconhecidas pela Organização Mundial da Saúde (OMS), está a Leishmaniose (OMS, 2022).

A leishmaniose é uma doença complexa, pois é causada por diferentes espécies do protozoário do gênero *Leishmania*, o qual é transmitido por insetos vetores e apresenta diversas formas de manifestações clínicas que compreendem úlceras cutâneas, mucocutâneas e viscerais. A complexidade da leishmaniose está associada aos fatores de risco para a doença que incluem pobreza, migração populacional, desnutrição, falta de higiene e um estado imunocomprometido (Mann, 2021).

De modo geral, as leishmanioses se dividem em leishmaniose tegumentar americana, que acomete pele e mucosas, e leishmaniose visceral (ou Calazar), que acomete órgãos internos (Fiocruz, 2013, disponível em: <https://agencia.fiocruz.br/leishmaniose>). A leishmaniose tegumentar (LT), constitui um problema de saúde pública em 85 países, com registro anual de 0,7 a 1,3 milhão de novos casos. A LT merece muita atenção, devido à sua magnitude, e também pelo risco de ocorrência de deformidades que pode induzir no ser humano, o que traz consigo danos psicológicos, com reflexos no campo social e econômico (Brasil, 2017). Portanto, o diagnóstico precoce da LT é de extrema importância para que o paciente receba o tratamento adequado.

Dentre os testes para o diagnóstico da LT, destaca-se a reação intradérmica de Montenegro ou Intradermorreação de Montenegro (IDRM). Esse teste é empregado desde a década de 20 devido às vantagens que apresenta, tais como alta sensibilidade e especificidade diagnósticas, facilidade na execução e baixo custo. Devido a essas características, o emprego da IDRM é amplamente difundido para complementar o diagnóstico clínico da leishmaniose e, tornou-se o principal exame de rotina, não apenas no Brasil como no mundo (da Silva, 2007). Desse modo, a produção do Antígeno de Montenegro, que é o medicamento necessário para execução da IDRM, foi escalonada para atender a alta demanda de testes.

No ano de 1995, o Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos (CPPI) localizado em Piraquara, Paraná, Brasil passou a fornecer o Antígeno de Montenegro para o Ministério da Saúde (Secretaria da Saúde do Estado do Paraná, disponível em: <https://www.saude.pr.gov.br/Pagina/CPPI-Centro-de-Producao-e-Pesquisa-de-Imunobiologicos>) e, em 2017 a produção do antígeno foi descontinuada, pois a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) requereu adequações na infraestrutura do local de produção do antígeno equiparáveis às condições necessárias para produção de vacinas (Braz, 2019).

A fim de retornar a produção para a distribuição do Antígeno de Montenegro, o CPPI está em processo de adequação às exigências da ANVISA. Para tanto, um dos desafios desse retorno é quantificar com maior exatidão e precisão as proteínas da solução antigênica, visto que a quantidade de proteínas injetadas determina a intensidade da resposta imunológica<sup>1</sup>. O protocolo empregado pelo CPPI para quantificação de proteínas antigênicas é o método de Kjeldahl. No entanto, esse método apresenta muitas desvantagens que serão discutidas ao longo do presente trabalho.

## 1.1 JUSTIFICATIVA

O retorno da produção do Antígeno de Montenegro de 1<sup>a</sup> geração pelo CPPI se torna de suma importância, uma vez evidenciada a demanda de testes de auxílio diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana, doença negligenciada de grande prevalência nas Américas, em áreas endêmicas que são de difícil acesso e carentes de infraestrutura em Saúde.

Para a produção em larga escala do Antígeno de Montenegro, há a necessidade de que os requisitos regulatórios para produção sejam rigorosamente atendidos e que todas as etapas da produção sejam devidamente controladas e otimizadas. Uma dessas etapas é justamente a quantificação exata e precisa da concentração de proteínas antigênicas dispensadas nos frascos.

O método que estava sendo empregado para determinação da concentração de proteínas era o método de Kjeldahl, que dosa o nitrogênio total em uma amostra, mas apresenta algumas desvantagens como várias etapas de execução, que atrasam o tempo de execução, o uso de solventes corrosivos, entre outros. Diante

---

<sup>1</sup> Fala da bióloga responsável pela produção do antígeno no CPPI, Regiane Szargiki.

disso, a proposta é substituir o método de Kjeldahl por um método que quantifique as proteínas com exatidão e precisão e, de execução simples e rápida.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo geral

Substituir o método de Kjeldahl para a dosagem de proteínas totais antigênicas do Antígeno de Montenegro empregado para o diagnóstico da leishmaniose.

### 1.2.2 Objetivos específicos

- Realizar dosagem de nitrogênio total na solução do Antígeno de Montenegro por método de Kjeldahl (semi-micro determinação);
- Realizar dosagem de proteínas totais na solução do Antígeno de Montenegro por método fluorimétrico;
- Comparar estatisticamente os resultados obtidos pelos métodos testados e selecionar o método mais adequado com base na repetibilidade dos valores de concentração.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

A revisão de literatura abordará o conceito sobre as leishmanioses com foco na leishmaniose tegumentar; a estratégia para o diagnóstico dessa patologia; o diagnóstico através do teste de intradermorreação de Montenegro; a quantificação e padronização do conteúdo proteico do Antígeno de Montenegro; e os métodos de dosagem de proteínas que podem ser utilizados.

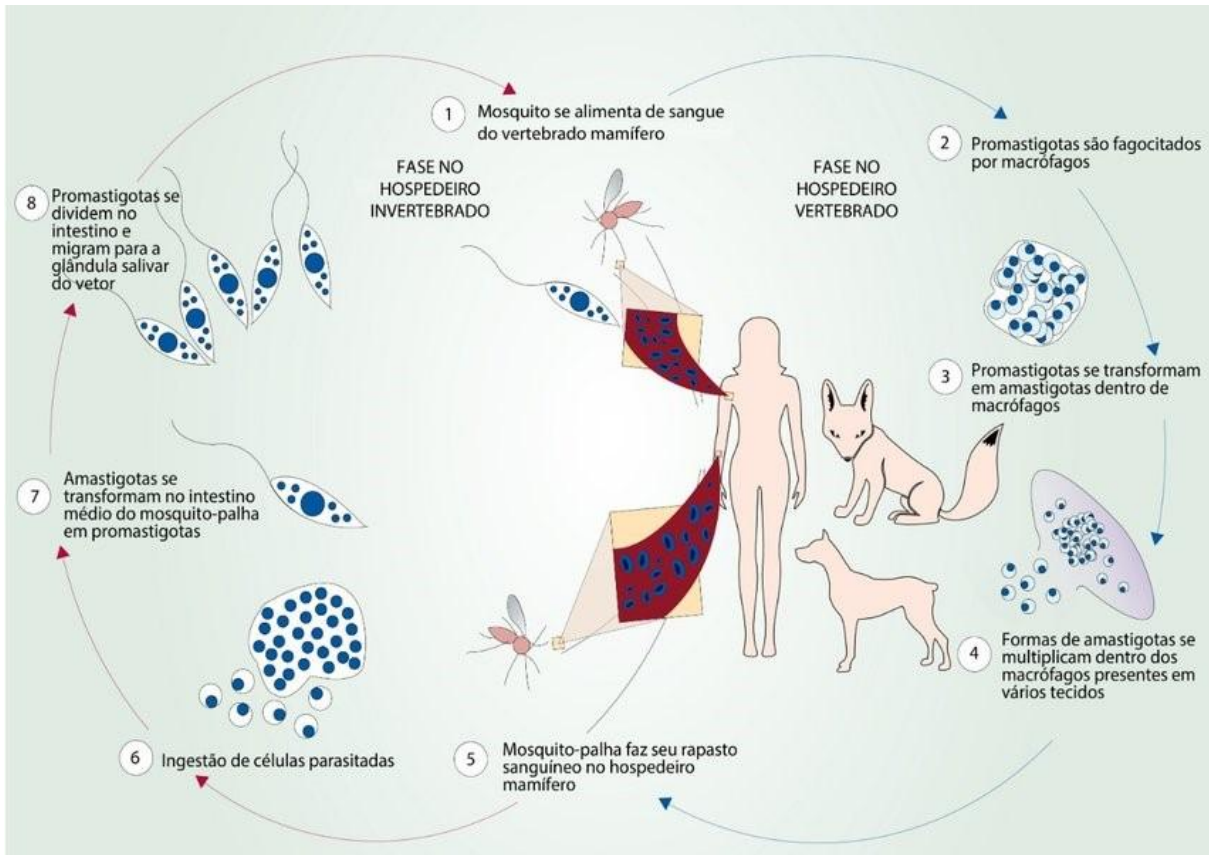
### 2.1 LEISHMANIOSES

As leishmanioses são doenças infecciosas, não contagiosas causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, que são predominantes em áreas tropicais e subtropicais. Os protozoários podem infectar e permanecer localizados na pele ou disseminar para mucosa da nasofaringe, medula óssea, baço, fígado e outros órgãos, resultando nas formas apresentações clínicas da doença, conhecidas como tegumentar e visceral (MSD; GOTO et al., 2012).

Os ciclos de transmissão das leishmanioses variam de acordo com a região geográfica e envolvem uma diversidade de espécies de parasito, vetores, reservatórios e hospedeiros. A transmissão da leishmaniose ocorre através de insetos hematófagos conhecidos como flebotomos ou flebotomíneos, que de acordo com a região recebem diferentes denominações, como mosquito palha, tatuquira, birigui, cangalhinha, asa branca, asa dura e palhinha (BVSMS, 2007).

Durante o processo de hematofagia, as fêmeas de flebotomíneos infectadas injetam as formas promastigotas de *Leishmania* no hospedeiro vertebrado. Os promastigotas que atingem o local da punção, são fagocitados por macrófagos e outros tipos de células mononucleares fagocíticas e evoluem para as formas amastigotas, que se multiplicam e passam a infectar outras células fagocíticas mononucleares (CDC, 2020).

Durante o processo hematofágico, o flebotomíneo ingere sangue contendo macrófagos infectados com amastigotas, os quais ao atingirem o intestino do mosquito evoluem para forma promastigota. Os promastigotas se multiplicam e migram para as glândulas salivares do mosquito, que ao picar outro hospedeiro, injetam o protozoário nesse novo hospedeiro vertebrado (CDC, 2020) (Figura 1).

Figura 1 - Ciclo biológico e de transmissão de *Leishmania*

FONTE: Toledo (2020)

Conforme apresentado na Figura 1, são considerados hospedeiros vertebrados, o homem e hospedeiros que constituem os reservatórios silvestres ou domésticos das *Leishmanias*. Os reservatórios são geralmente canídeos, mas felídeos eventualmente também servem de reservatório (Toledo, 2020). Nos reservatórios silvestres a infecção tende a ser benigna e muitas vezes é inaparente (Toledo, 2020).

### 2.1.1 Leishmaniose tegumentar americana (LTA)

A leishmaniose tegumentar é uma infecção zoonótica que acomete pele e mucosas e afeta outros animais que não o ser humano, o qual pode ser envolvido secundariamente no ciclo biológico da doença (Brasil, 2017). As leishmanioses tegumentares (LT) são caracterizadas pela diversidade das espécies de *Leishmania*, de reservatórios e vetores que ocorrem em ambiente silvestre ou peridoméstico e, de manifestações clínicas (Goto e Lindoso, 2012).

A LT tem ampla distribuição mundial e no Continente Americano há registro de casos desde o extremo sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, com exceção do Chile e do Uruguai (BRASIL, 2020). Ao considerar apenas o continente americano, 12 espécies dermatrópicas de *Leishmania* causadoras de doença humana são reconhecidas e apenas oito espécies são descritas em animais. No Brasil, já foram identificadas sete espécies, sendo seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*. As três principais espécies são: *L. (V.) braziliensis*, *L.(V.) guyanensis* e *L.(L.) amazonensis* e, mais recentemente, as espécies *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg* e *L. (V.) shawi* foram identificadas em estados das regiões Norte e Nordeste do Brasil (Brasil, 2017).

Nas Américas, a LTA é considerada uma zoonose primária de mamíferos silvestres (roedores, marsupiais, edentados e primatas). O homem adquire a infecção ao entrar em contato com as áreas florestais onde existem as enzootias pelas diferentes espécies de *Leishmania*. Dessa forma, a LT pode ser (1) puramente silvestre, a qual é associada à derrubada das matas (construção de estradas, instalação de povoados em regiões pioneiras) e à exploração desordenada das florestas (extração de madeira, agricultura, mineração); (2) silvestre modificada, que ocorre através de surtos epidêmicos sazonais, em áreas com pequenos focos residuais de mata primária; (3) periurbana, que ocorre de forma endo ou peridomiciliar, em áreas onde há suspeita da participação de animais domesticados como reservatórios (cães e equinos) (Basano, 2004).

As manifestações clínicas da LT podem compreender formas cutâneas e mucocutâneas, cuja distribuição pode ser localizada, disseminada e pode diferir entre o Velho (Europa, África e Ásia) e no Novo Mundo (Continente Americano) (Goto e Lindoso, 2012). Nas Américas, um total de 1.067.759 casos novos de leishmaniose cutânea (LC) e mucosa (LM) foram reportados por 17 dos 18 países endêmicos no período de 2001-2019, com uma média anual de 53.387 casos. Em 2020, os países que notificaram o maior número de casos foram Brasil (16.432), Colômbia (6.161), Peru (4.178), Nicarágua (3.443) e Bolívia (Estado Plurinacional de) (2.059), que juntos representaram 81% dos casos da Região (OPAS, 2021).

A forma cutânea localizada da LT é caracterizada por lesões que ocorrem no local da picada do flebotomíneo, que geralmente são áreas expostas do corpo, como face e extremidades. A manifestação clínica é caracterizada pelo aparecimento de uma pápula eritematosa que evolui progressivamente para uma úlcera com bordas

elevadas, endurecidas e fundo com tecido de granulação grosseira, geralmente indolor, no ponto de inoculação das promastigotas infectantes, através da picada do vetor (Vasconcelos et al, 2018; Mann et al, 2021). A forma cutânea disseminada da LT é caracterizada pelo aparecimento de múltiplas lesões papulares e de aparência acneiforme que acometem vários segmentos corporais, envolvendo com frequência a face e o tronco (Vasconcelos et al, 2018; Mann et al, 2021).

A forma mucocutânea ou mucosa da LT é caracterizada por lesão secundária que atinge inicialmente a mucosa do nariz e boca com posterior envolvimento da faringe e laringe e ao contrário da doença cutânea, a forma mucosa não cicatriza espontaneamente (Vasconcelos et al, 2018; Mann et al, 2021). Como ocorre comprometimento do septo cartilaginoso e destruição do nariz e boca, a forma mucosa apresenta as manifestações clínicas mais desfigurantes da doença e o surgimento dessas deformidades faciais podem ocorrer anos após o desaparecimento dos sintomas cutâneos iniciais (Mann et al, 2021). Além disso, os pacientes frequentemente relatam sinais e sintomas nasais crônicos, incluindo secreções, sangramento e dor; evidência de ulceração e inflamação (Mann et al, 2021).

Diante das manifestações clínicas da LT, o diagnóstico e o tratamento precoce são indispensáveis para melhorar o prognóstico, reduzir chances de mutilação e minimizar deformidades e sequelas.

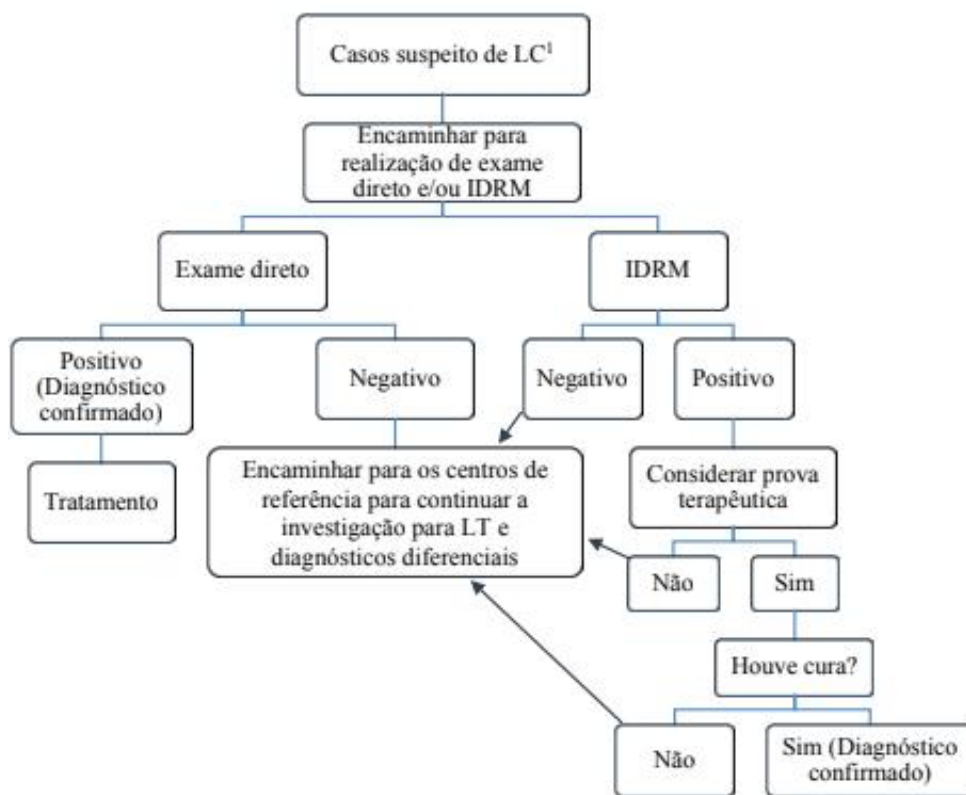
## 2.2 DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE

Na circunstância de lesões típicas de leishmaniose é possível presumir o diagnóstico para a doença quando associadas à procedência do paciente de áreas endêmicas ou de lugares onde há casos de leishmaniose ou pela resposta terapêutica do paciente (Vasconcelos et al, 2018).

A aplicação e sensibilidade de cada método diagnóstico para leishmaniose pode variar de acordo com as formas clínicas, o tempo de evolução das lesões, das diferentes espécies de *Leishmania* envolvidas, além da experiência de cada serviço e da qualidade dos equipamentos e insumos utilizados. Desse modo, o diagnóstico da doença se torna complexo e envolve a associação de aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais (Anversa, 2018 e Brasil, 2017).

Nos casos suspeitos, quando o indivíduo apresenta lesões de pele ulceradas ou não com 3 semanas ou mais de evolução sendo residente ou exposto à área de transmissão, o teste Intradermoreação de Montenegro (IDRM) e/ou exame direto são os primeiros passos clínicos (Brasil, 2017). Após resultado positivo do exame direto, há confirmação de diagnóstico, e após resultado positivo da IDRM, pode-se prosseguir com testes sorológicos ou outras investigações e diagnósticos diferenciais, como demonstrado na figura 2.

Figura 2 - Diagnóstico da leishmaniose tegumentar cutânea




FONTE: Brasil, 2017

Os procedimentos para o exame direto ou a pesquisa direta do parasita na lesão compreendem a escarificação da borda da lesão, ou biópsia com impressão do fragmento cutâneo em lâmina por aposição ou punções aspirativas (BRASIL, 2017). O material colhido é corado com derivados do *Romanowsky – Giemsa* ou *Leishman* e observadas no microscópio ótico para pesquisa de formas amastigotas (Brasil, 2017). Apesar da pesquisa direta ser rápida, de baixo custo e fácil execução, o tempo da lesão é inversamente proporcional às chances de detecção de parasitos

e infecções secundárias também diminui a sensibilidade diagnóstica (Goto, 2012; Brasil, 2017).

Além do exame parasitológico direto, a identificação do parasita pode ser realizada por métodos indiretos, dentre eles citam-se (1) isolamento em cultivo *in vitro*, no qual fragmentos cutâneos ou de mucosa obtidos por biópsia da borda da lesão são inoculados em meios de cultivo específicos; (2) Isolamento *in vivo*, por meio de inoculações intradérmicas de raspados ou biópsias das lesões no focinho e/ou patas de hamsters. Esse método apresenta elevada sensibilidade, mas é pouco realizado devido aos custos e complexidade (Brasil, 2017); (3) Reação em cadeia da polimerase (PCR), que se baseia na amplificação do DNA do parasito presente na pele e mucosa e por isso, apresenta elevada especificidade e sensibilidade que, no entanto, apresenta custo elevado (Brasil, 2017).

 Outra possibilidade diagnóstica para Leishmaniose é o exame histopatológico que se baseia na detecção de granulomas “tubercoloides”, com infiltrado inflamatório linfoplasmocitário e eventualmente necrose. No entanto, granulomas do tipo “sarcoides” e em paliçada também podem ser visualizados, bem como dermatites inespecíficas. Portanto, a confiabilidade do diagnóstico depende da detecção intra ou extracelular das formas amastigostas de *Leishmania* sp (Brasil, 2017).

O diagnóstico diferencial com outras doenças sempre deve ser considerado, uma vez que as características da lesão possuem muitas semelhanças, de acordo com a forma clínica, por exemplo com as lesões de tuberculose, de algumas micobacterioses atípicas, as de paracoccidiodomicose cutânea, de úlceras decorrentes da anemia falciforme, de ceratoacantoma, de linfoma cutâneo, de esporotricose, entre outras (Brasil, 2017). Esse diagnóstico pode ser feito através do encontro do parasita ou através de testes imunológicos, microbiológicos, citológicos e/ou avaliação histológica (Handler et al., 2015; Vasconcelos et al., 2018).

Os exames imunológicos também podem ser empregados para o diagnóstico da leishmaniose e compreendem a Intradermorreação de Montenegro (IDRM), que será abordada no item 2.2.1 e os testes sorológicos, tais como teste de imunofluorescência para detectar anticorpo, ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA); imunocromatografia, teste de aglutinação direta, Western Blot, entre outros (Lévêque et al., 2020).

### 2.2.1 Teste de Intradermorreação de Montenegro

O teste de Intradermorreação de Montenegro (IDRM) ou teste cutâneo de Montenegro ou teste cutâneo de *Leishmania* avalia a resposta de hipersensibilidade tardia (Gomes et al., 2014). O IDRM consiste de uma injeção intradérmica de uma solução contendo antígenos de promastigotas (leishmanina) de *Leishmania* para induzir e visualizar a resposta imune adaptativa em indivíduos previamente infectados com o parasita (Gomes et al., 2014; Carstens-Kassl et al., 2021).

O teste de IDRM apresenta resultado positivo com o surgimento de uma pápula endurecida, igual ou maior que 5mm após 48 horas da aplicação da injeção intradérmica na região anterior do antebraço (Gomes et al., 2014; Mattos, 2017). Os limites da pápula são demarcados com caneta esferográfica e o diâmetro da pápula é medido com uma régua. A cerca de 3 cm de distância do eritema visível, iniciam-se riscos com a caneta esferográfica em direção à pápula até que uma leve resistência no traçado seja sentida, indicando o início da endureção, como demonstrado na Figura 3. O diâmetro da pápula é delimitado por 4 riscos (Mattos, 2017)

Figura 3 - Delimitação da área ao redor do eritema decorrente do teste de intradermorreação de Montenegro



FONTE: Mattos (2017)

Como apresentado, é um teste minimamente invasivo, de baixo custo, que apresenta uma alta sensibilidade, chegando acima de 90%. Já a especificidade varia em torno de 75% e este percentual relativamente baixo é decorrente do número

elevado de resultados falso-positivos em casos de infecção e reatividade cruzada com algumas patologias, como doença de Chagas, micoses subcutâneas, tuberculose, hanseníase virchowiana, bem como problemas com a execução da técnica (Szargiki, 2005; Gomes et al., 2014)

Historicamente, o primeiro registro do uso de antígeno para intradermoreação com proteínas totais de *Leishmania* com a finalidade de avaliação imunológica, data do ano de 1924, por João Montenegro, com publicação nacional em 1926. A formulação original do produto no Brasil consistia de extratos alcalinos preparados com *Leishmania braziliensis*.

Em artigo publicado em 1977, Melo e colaboradores propuseram uma padronização para o produto, que consistia em uma suspensão de  $10^6$  promastigotas de *Leishmania braziliensis* por mililitro previamente rompidas por ultrassom, diluídas em salina merthiolatada. Posteriormente, o uso de Merthiolate (thimerosal) foi desaprovado e vetado pela ANVISA e pela Organização Mundial da Saúde, como conservante por causar reação alérgica mais intensa, o que poderia levar a interpretação falso-positiva da resposta do teste intradérmico. Além disso, era relatado desconforto dos pacientes no momento da aplicação do antígeno. O thimerosal foi então substituído por fenol no Antígeno de Montenegro, à concentração de 0,4 ou 0,5 g% em salina fisiológica, por conferir menor reação e nenhum desconforto (da Silva, 2017).

Quando Montenegro demonstrou pela primeira vez o uso da IDRM em humanos, ele alertou contra aceitar o resultado do teste sem antes avaliar a preparação do antígeno, destacando a necessidade de uma leishmanina padronizada (Carstens-Kassl et al., 2021). No início da década de 1990, o Programa Especial de Pesquisa e Treinamento em Doenças Tropicais (TDR) da Organização Mundial da Saúde solicitou submissões de leishmaninas padronizadas de instituições de todo o mundo. As três submissões recebidas foram uma leishmanina derivada de *Leishmania amazonensis* da Universidade de Minas Gerais, Brasil; uma leishmanina derivada de *Leishmania infantum* do Istituto Superiore de Sanità, Itália e uma leishmanina derivada de *Leishmania major* do Instituto Pasteur, Irã. A leishmanina iraniana foi selecionada e amplamente distribuída pelo TDR, mas por razões desconhecidas, a distribuição foi encerrada. Algumas instituições, incluindo as mencionadas acima, continuaram brevemente a produzir leishmanina em menor escala (Carstens-Kassl et al., 2021).

O CPPI localizado em Piraquara, Paraná, Brasil foi a última empresa produtora da leishmanina brasileira até 2017, quando a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) redefiniu seus requisitos para a fabricação do reagente (Braz, 2019; Carstens-Kassl et al., 2021).

O Antígeno de Montenegro produzido pelo CPPI possuía registro na ANVISA como produto correlato, mas deverá ser considerado medicamento, o que implica o cumprimento de normas de fabricação muito mais abrangentes do que as exigidas para a fabricação e registro de produtos Correlatos, e também implica a necessidade de mudanças no Controle de Qualidade para atender aos requisitos regulatórios específicos da nova classificação (da Silva, 2007). O produto do CPPI é considerado de 1ª geração por ser produzido a partir de uma única espécie de *Leishmania* e com o parasita morto<sup>2</sup>.

Portanto, a fim de retornar a produção e distribuição do Antígeno do Montenegro, o CPPI está comprometido em cumprir os requisitos impostos pela ANVISA e, sob o novo registro, lotes pilotos do Antígeno de Montenegro de 1ª geração voltou a ser produzido em 2021 e envasado em frascos de vidro na forma de suspensão contendo  $10^7$  promastigotas de *Leishmania amazonensis* por mililitro (mL). A suspensão é apirogênica, livre de traços de antibióticos, multidose para aplicação intradérmica e tem sido empregada exclusivamente para fins de pesquisa em animais (Figura 4). No entanto, ainda há a necessidade de padronizações e dentre essas, o estabelecimento do método analítico para a quantificação da concentração das proteínas antigênicas referente a concentração de  $10^7$  parasitas/mL<sup>2</sup>.

---

<sup>2</sup> Fala da bióloga responsável pela produção do antígeno no CPPI, Regiane Szargiki.

Figura 4 - Antígeno de Montenegro produzido pelo CPPI para uso exclusivo para pesquisa em animais



FONTE: A autora (2021)

### 2.3 MÉTODOS DE DOSAGEM DE PROTEÍNAS

Após o trabalho de Melo et al. (1977), que correlacionou a eficácia do antígeno de Montenegro à concentração de antígenos protéicos presentes, foi estabelecida a dose de 40 microgramas de nitrogênio proteico por mililitro de suspensão (40 $\mu$ g/mL). Essa concentração de nitrogênio proteico proposta por Melo era dosada pelo método de Nessler (Passos, 2004). Esse método tornou-se obsoleto na rotina por ser de alto custo e de alto risco para a saúde do técnico executor do procedimento, sendo então substituído pelo método de Kjeldahl, o qual é muito utilizado para doseamento de proteínas em grande quantidade, porém pouco sensível para soluções com mínimas quantidades de proteínas (Passos, 2004).

Para o Antígeno de Montenegro produzido pelo CPPI foi validada a concentração de nitrogênio proteico igual ou superior a 26 $\mu$ g/mL dosada pelo método de Kjeldahl. Para obter resultados mais precisos com esse método é preciso utilizar um volume grande de amostra por dosagem (chegando a 300mL em alguns equipamentos), uma vez que o produto possui uma baixa concentração de nitrogênio. Mesmo utilizando o método de micro Kjeldahl, que possibilita o uso de menor quantidade de amostra, ao longo dos anos de produção, outras desvantagens do método foram evidenciadas como a demora do processo, a necessidade de equipamento específico, a utilização de reagentes corrosivos e a possibilidade de

superestimar as concentrações de proteínas, pois nem todo nitrogênio está na forma proteica (Miwa, Falco e Calijuri, 2008).

Existem diversos métodos para a determinação de proteínas totais, que foram desenvolvidos para diferentes amostras, tais como em extratos de células bacterianas (Biureto), proteínas dissolvidas (Bradford), soluções que contenham detergentes (BCA – Ácido Bicinconínico), proteína pura (absorção UV), alimentos (Biureto, Lowry, Bradford), plasma sanguíneo (Biureto, Lowry, Bradford), plantas (Lowry), entre outras (Miwa, Falco, Calijuri, 2008). A fim de buscar o método que quantifique com o máximo de exatidão a concentração de proteínas na suspensão de promastigotas, o presente projeto testou outras metodologias de dosagem de proteínas totais: semi-micro determinação pelo método de Kjeldahl, método fluorométrico e os métodos colorimétricos de Bradford e Biureto, os quais não foram descritos, pois não apresentaram sensibilidade para a quantificação de proteínas.

### 2.3.1 Método de Kjeldahl

O método de Kjeldahl é um método tradicional para a determinação de proteínas em alimentos, rações e para a maioria dos compostos nitrogenados que ocorrem nos solos e plantas (Ferreira; Monteiro; Silva, 2001). O método quantifica nitrogênio total através de 3 etapas: digestão, destilação e titulação. (1) Digestão: a amostra é digerida com ácido sulfúrico concentrado sob aquecimento contínuo, levando à conversão do nitrogênio orgânico em íon amônio. (2) Destilação: a solução obtida é alcalinizada com hidróxido de sódio concentrado. A amônia produzida nessa etapa é, então, destilada em equipamento específico. (3) Titulação: a amônia é recuperada em uma solução de ácido bórico, e titulada com ácido clorídrico de concentração conhecida e padronizada. O teor de proteína bruta da amostra é obtido pela multiplicação do teor de nitrogênio total pelo fator de conversão (6,25) (Salman et al., 2010).

O método de Kjeldahl apresenta alto nível de precisão, reprodutibilidade, aparelhagem pouco onerosa, simples aplicação e pode quantificar microgramas de proteína (micro Kjeldahl). No entanto, as desvantagens do método são a falta de especificidade na presença de compostos com ligações N-N e N-O (Ferreira; Monteiro; Silva, 2001); possibilidade de superestimar as concentrações de proteínas, uma vez que dosa teor de nitrogênio de fontes não proteicas (ureia, aminoácidos,

ácidos húmicos, entre outros) (Miwa, Falco, Calijuri, 2008); processo demorado; utiliza reagentes corrosivos e necessita de grandes volumes de amostra. O volume de amostra necessário classifica o método em micro, semi-micro ou semi-macro e macro Kjeldahl, utilizando-se na digestão tubos de até 100mL, até 400mL e até 800mL, respectivamente (Tecnal, disponível em: [https://tecnal.com.br/pt-BR/blog/335\\_8\\_duvidas\\_classicas\\_sobre\\_a\\_digestao\\_na\\_analise\\_de\\_proteina](https://tecnal.com.br/pt-BR/blog/335_8_duvidas_classicas_sobre_a_digestao_na_analise_de_proteina)).

### 2.3.2 Método por fluorimetria

A fluorimetria é uma técnica utilizada para determinação qualitativa ou quantitativa de substâncias, baseada no fenômeno da fluorescência. Fluorescência é o resultado da liberação de energia quando uma molécula retorna de seu estado excitado singlete para o seu estado fundamental. Para liberação dessa energia, a molécula absorve previamente a energia radiante passando do estado fundamental singlete (baixa energia) para o estado excitado singlete (alta energia) (Vilasboas e Santos e Gil, 2010).

Essa técnica tem sido utilizada em diversos campos de aplicação como determinação de espécies orgânicas e inorgânicas, para determinar metais pesados por sensores ópticos, medição de oxigênio, quantificação de fármacos em medicamentos (de Vilasboas e Santos e Gil, 2010) e quantificação de proteínas, DNA e RNA (Qubit, 2023).

O método fluorimétrico apresenta sensibilidade consideravelmente maior em comparação a outras metodologias, entre elas a espectrofotometria UV/visível, apresentando limites de detecção de até três ordens de grandeza menores, os quais normalmente se encontram na faixa de ng/mL, sendo consequência do baixo sinal de fundo que as medidas fluorescentes apresentam (Sotomayor et al., 2008). O fato de que um único fluoróforo pode gerar muitos milhares de fótons detectáveis é fundamental para a alta sensibilidade das técnicas de detecção de fluorescência (Qubit, 2023).

Outra vantagem da fluorimetria é a alta seletividade do método, uma vez que espécies com rendimentos quânticos de fluorescência detectáveis são menos comuns do que substâncias cuja fluorescência não pode ser detectada. Desta forma, moléculas fluorescentes apresentam comprimento de onda característico de excitação e/ou emissão. Esses métodos apresentam ampla faixa linear de

resposta, simplicidade instrumental e o baixo custo de manutenção e análise, quando comparados com outros métodos analíticos (Sotomayor et al., 2008).

Deve-se atentar para o fato de que somente certas classes de substâncias exibem luminescência nativa, além disto, devem ser considerados os efeitos de espalhamento e reabsorção. Isto tem limitado o uso dos métodos luminescentes quando comparados a outros métodos analíticos, como cromatografia e espectrometria UV/visível. Entretanto, muitas vezes é possível converter moléculas não fluorescentes em derivados fluorescentes usando reagentes específicos, ou aproveitar a fluorescência de compostos que reagem quantitativamente com o analito de interesse. Para que o método fluorométrico seja efetivo na quantificação do analito, alguns cuidados são requeridos, como evitar evaporação, adsorção, instabilidade do analito, fenômenos de “*quenching*”, reação com traços de impureza e com oxigênio dissolvido (Sotomayor et al., 2008).

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 AMOSTRAS**

O CPPI concedeu para análise dois lotes do antígeno de Montenegro: Amostra 1, lote L01/2012, produzido em 2012, que já possuía laudo de análise, do ano de 2012, do Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR) com resultado de 30µg/mL de nitrogênio total; e Amostra 2, lote 3220801, produzido em 2021, para uso exclusivo para pesquisa em animais, com concentração de proteínas a ser determinada.

#### **3.2 MÉTODO DE KJELDAHL (SEMI-MICRO DETERMINAÇÃO)**

O volume da solução de Antígeno de Montenegro empregado para o método de Kjeldahl foi 40mL (Amostra 1). A análise foi realizada em triplicata no laboratório de Biotecnologia da UFPR que dispunha do digestor DK 20 *Digestion Unit* (VELP *Scientifica*, Usmate Velate, Itália) e destilador automático com titulador UDK 159 *Automatic Kjeldahl Analyzer* (VELP *Scientifica*, Usmate Velate, Itália. A metodologia foi realizada conforme procedimento descrito no Manual de Operação do equipamento UDK 159.

Figura 5 - Digestor DK 20 *Digestion Unit* e destilador automático com titulador UDK 159 *Automatic Kjeldahl Analyzer*, respectivamente



FONTE: <https://www.velp.com/>

Para verificar o funcionamento do DK 20 *Digestion Unit*, acesse:

[https://www.youtube.com/watch?v=o\\_ZCXNIhtaA](https://www.youtube.com/watch?v=o_ZCXNIhtaA) . Para verificar o funcionamento do UDK 159 *Automatic Kjeldahl Analyzer*, acesse: <https://www.youtube.com/watch?v=zx2IFp8gvHE>.

### 3.3 FLUORIMETRIA

A análise foi realizada em sextuplicatas independentes, no laboratório de Controle de Qualidade Físico-Químico do CCPI. O fluorímetro empregado foi o Qubit® Fluorometer 1.0 (Invitrogen. Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) juntamente com o kit Qubit® Protein Assay. A metodologia foi realizada conforme procedimento descrito no Procedimento Operacional Padrão número 3.10.22 do CPPI. Uma solução de trabalho foi preparada a partir de uma solução padrão com um reagente fluorescente. Em tubos de 0,5mL, 20µL da amostra foi diluída 10 vezes com a solução de trabalho para um volume final de 200µL, homogeneizada em vórtex por 3 segundos e deixada em repouso e ao abrigo da luz por 15 minutos e, por fim foi realizada a leitura no equipamento.

Cabe ressaltar que o guia do usuário do kit utilizado informa que o volume da amostra a ser empregado, pode ser 10µL a 20µL, dependendo da concentração de

proteínas. Como a concentração do Antígeno é ensaiada para 26µg/mL, portanto, um valor baixo, foi selecionado o maior volume para o teste (20µL).

Figura 6 - Equipamento Qubit Fluorometer 1.0



FONTE: <https://www.thermofisher.com/br/en/home.html>

### 3.4 REPETIBILIDADE

A precisão intra-corrída (repetibilidade) é parâmetro imprescindível a qualquer método oficial. A metodologia consiste em analisar amostras em sextuplicata (duas triplicatas realizadas no mesmo dia pelo mesmo analista) e calcular o desvio padrão relativo (DPR) das concentrações obtidas entre as replicatas analisadas. A precisão é expressa em termos de imprecisão (perda de concordância entre resultados de testes independentes obtidos sob determinadas condições) e calculada como um desvio padrão relativo dos resultados do teste (AOAC, 2016). O cálculo do valor de DPR é demonstrado abaixo.

$$\text{DPR} = \frac{\text{DP} * 100}{\text{média}}$$

O critério de aceitação para precisão intra-corrída foi o valor de DPR menor ou igual a 2,7%, consultado no Apêndice F da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC), conforme previsto pela RDC 166/17, considerando a concentração do analito na amostra, de aproximadamente 1%.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 MÉTODO DE KJELDAHL (SEMI-MICRO DETERMINAÇÃO)

Os resultados de leitura da sextuplicata da Amostra 1 são apresentados na Tabela 1. O equipamento apresenta o resultado em miligramas de nitrogênio total, que foi convertido para microgramas. O cálculo para demonstração do resultado em  $\mu\text{g/mL}$  leva em consideração a tomada de amostra de 40mL, como apresentado abaixo.

$$\begin{array}{l} \mu\text{g de N} \text{ ----- } 40\text{mL} \\ \text{Resultado } (\mu\text{g/mL}) \text{----- } 1\text{mL} \end{array}$$

Tabela 1 - Nitrogênio total quantificado em solução de Antígeno de Montenegro

Amostra	Nitrogênio total ( $\mu\text{g}$ de N)	Nitrogênio total ( $\mu\text{g/mL}$ )	Média ( $\mu\text{g/mL}$ )	D.P.* ( $\mu\text{g/mL}$ )	D.P.R.**(%)
A1	700	17,5	<b>21,8</b>	<b>6,3</b>	<b>28,7</b>
A2	1098	27,5			
A3	644	16,1			
A4	1025	25,6			
A5	1160	29,0			
A6	600	15,0			


FONTE: A autora (2023)

\*Desvio Padrão

\*\*Desvio Padrão Relativo

O DPR de 28,7% (Tabela 1) indica que a quantificação de proteínas na Amostra 1 pelo método de Kjeldahl apresentou baixa repetibilidade, pois conforme descrito no item 3.4, a variação aceitável para imprecisão analítica deve ser igual ou menor a 2,7%, (AOAC, 2016). Além disso, conforme informado no item 3.1, o nitrogênio total já havia sido previamente quantificado na Amostra 1 e o valor obtido foi 30 $\mu\text{g/mL}$ . Ao comparar esse resultado com o obtido no presente trabalho (21,8 $\mu\text{g/mL}$ ), também é possível observar a baixa reprodutibilidade do método.

Outro ponto a ser considerado é o grande volume de solução de Antígeno de Montenegro empregado no método de Kjeldahl. Após a produção do Antígeno, cada frasco de vidro recebe 1mL da solução. Portanto, 120 frascos de cada lote produzido de Antígeno de Montenegro seriam destinados para a quantificação de proteínas em triplicata, uma vez que o método de Kjeldahl requer 40mL em cada replicata.

 Por fim, conforme discutido anteriormente, as outras desvantagens do método é a possibilidade em superestimar a concentração de proteínas, já que o nitrogênio total é quantificado, o emprego de reagentes corrosivos, principalmente o ácido sulfúrico concentrado na digestão, e a necessidade de equipamentos específicos.

## 4.2 FLUORIMETRIA

O princípio do método fluorométrico para quantificação de biomoléculas (proteínas, DNA, RNA) empregando o equipamento Qubit Fluorometer é baseado na reação entre a biomolécula e um fluoróforo específico. O fluoróforo livre apresenta baixa fluorescência, mas ao interagir com as biomoléculas emite alta fluorescência, que é capturada pelo detector do equipamento (Chauhan, 2018).

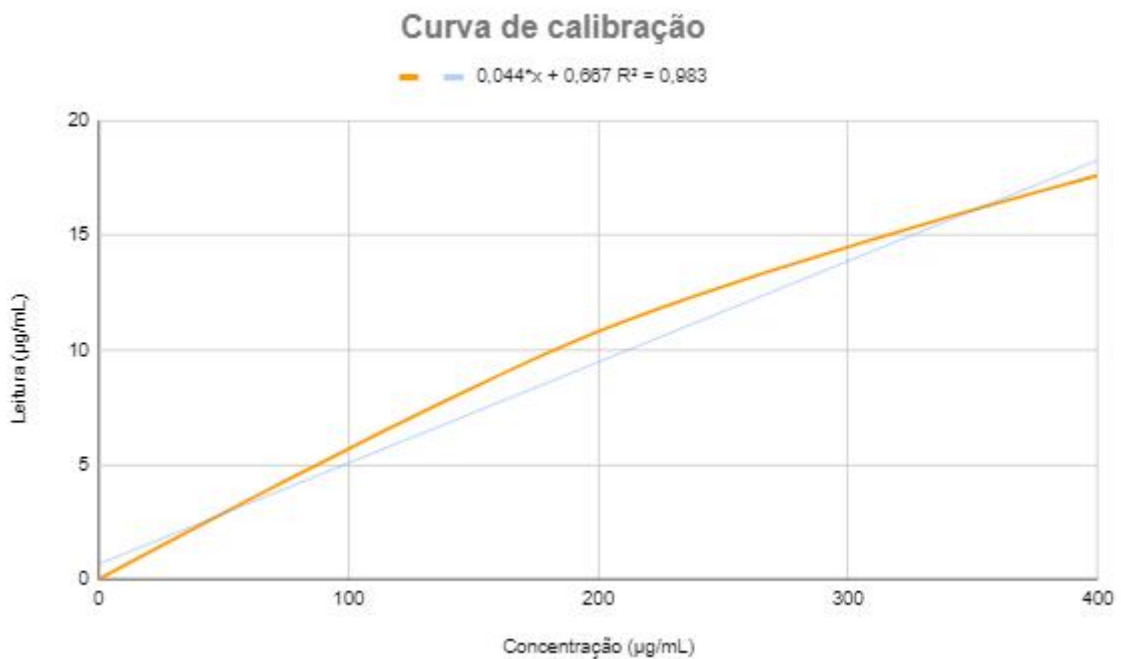
A primeira etapa do método é calibrar o equipamento. Os padrões 1, 2 e 3 do kit possuem concentração de 0, 200 e 400 $\mu$ g/mL, respectivamente, segundo o fabricante. O preparo de cada padrão envolve diluição de 10 $\mu$ L em reagente de cor para um volume final de 200 $\mu$ L, portanto a concentração de leitura esperada para cada padrão é resultante da divisão da concentração inicial pelo fator de diluição (200/10). Os resultados de leitura dos padrões são apresentados pelo equipamento já levando em consideração essa diluição como mostrado na Tabela 2. A linearidade da curva de calibração é demonstrada no Gráfico 1, com  $R^2 = 0,983$ .

Tabela 2 - Resultado de leitura dos padrões

Padrão	Concentração real (µg/mL)	Concentração esperada (µg/mL)	Leitura determinada (µg/mL)
1	0	0	<1
2	200	10	10,8
3	400	20	17,6

FONTE: A autora (2023)

GRÁFICO 1 - Curva de calibração dos padrões 1, 2 e 3 do Qubit Protein Assay Kits, com linha de tendência



FONTE: A autora (2023)

Eixo X = Concentração real; Eixo Y = leitura determinada.

Os resultados de leitura da sextuplicata da Amostra 2 são apresentados na Tabela 3. O fator de diluição leva em consideração a tomada de amostra de 20µL que foi diluída para a solução de leitura com volume final de 200µL.

Tabela 3 - Resultado de proteínas totais em µg/mL

<b>Amostra</b>	<b>Leitura (µg/mL)</b>	<b>Fator de diluição (200/20)</b>	<b>Resultado (µg/mL)</b>	<b>Média</b>	<b>D.P.*</b>	<b>D.P.R.** (%)</b>
1	2,67	10	26,7	<b>27,0</b>	<b>0,7</b>	<b>2,6</b>
2	2,83	10	28,3			
3	2,7	10	27,0			
4	2,64	10	26,4			
5	2,66	10	26,6			
6	2,67	10	26,7			

Fonte: A autora (2023)

\*Desvio Padrão

\*\*Desvio Padrão Relativo

A quantificação pelo método por fluorimetria possui faixa de leitura de 12,5 µg/mL a 5 mg/mL, sendo então sensível para a faixa de concentração esperada de proteínas totais para o Antígeno de Montenegro. Nos testes realizados, o método mostrou boa repetibilidade, com valor de DPR abaixo de 2,7%, além de requerer a utilização de pequena quantidade de amostra. O método, por quantificar proteínas totais, é mais seletivo e possui ainda as vantagens de utilizar reagentes de fácil aquisição, ser de rápida execução (reação entre o reagente de cor e a amostra leva 15 minutos) e requerer a utilização de equipamentos simples.

## 5 CONCLUSÕES

A quantificação de proteínas totais por fluorimetria apresentou vantagens em relação ao método de clássico de Kjeldahl. A quantificação pelo método de Kjeldahl mostrou baixa repetibilidade, com valor de DPR acima de 2,7% e, mesmo a semi-micro determinação, requereu grandes quantidades de amostra. O método pode superestimar as concentrações de proteína por quantificar nitrogênio total e possui as desvantagens de utilizar reagentes corrosivos e de requerer utilização de equipamentos específicos.

A fluorimetria apresentou boa repetibilidade, com valor de DPR abaixo de 2,7%, além de requerer a utilização de pequena quantidade de amostra. O método é mais específico por quantificar proteínas totais e possui ainda as vantagens de utilizar reagentes de fácil aquisição, ser de rápida execução e de requerer utilização de equipamentos simples. A quantificação por fluorimetria é um método alternativo vantajoso para ser incorporado ao processo de produção do Antígeno de Montenegro.

## REFERÊNCIAS

- ANALISA. Informe Técnico, kit para determinação das proteínas totais por metodologia colorimétrica. Ago. 2012.
- ANVERSA, L. [et al]. Human leishmaniasis in Brazil: A general review. **Rev. Assoc. Med. Bras.** Bauru - SP, 2018.
- A.O.A.C. 2016. Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements. Association of Official Analytical Chemist. EUA.
- BASANO, S. A.; CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, vol. 7, nº 3, 2004.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar**. Brasília, 2017.
- BRASIL, Ministério da Saúde, 2020. **Distribuição da Leishmaniose Tegumentar**. Disponível em: <[www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/lt/situacao-epidemiologica](http://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/lt/situacao-epidemiologica)>. Acesso em 17 jan. 2023.
- BRASIL. Resolução RDC 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, 25 de julho de 2017.
- BRAZ, L. M. et al. Tegumentary leishmaniasis diagnosis: what happened with MST (Montenegro Skin Test) in Brazil?. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, ed. 17, 19 fev. 2019.
- BVSMS. Biblioteca Virtual em Saúde, Ministério da Saúde, 2007. **Leishmaniose**. Disponível em: <<https://bvsms.saude.gov.br/leishmaniose-2/>>. Acesso em 17 jan. 2023.

BVSMS. Biblioteca Virtual em Saúde, Ministério da Saúde, 2022. 30/01 - Dia Mundial das Doenças Tropicais Negligenciadas. Disponível em: <<https://bvsms.saude.gov.br/30-01-dia-mundial-das-doencas-tropicais-negligenciadas/>>. Acesso em 26 jan. 2023.

CARSTENS-KASS, J. et al. **A review of the leishmanin skin test: A neglected test for a neglected disease**. J. PLOS, ed. 0009531, 21 jul. 2021.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention, 2020. **Parasites, Leishmaniasis, Biology**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>>. Acesso em 17 jan. 2023.

CHAUHAN, T. **A Comparative Review Between Qubit Vs Nanodrop**. Genetic Education, Reviews, 2018. Disponível em: <<https://geneticeducation.co.in/a-comparative-review-between-qubit-vs-nanodrop/>>. Acesso em 02 fev. 2023.

da SILVA, A. F. **A Reação Intradérmica de Montenegro na clínica e na epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar**. Tese. Doutorado em Vigilância Sanitária, Prog. Pós-Graduação em Vigilância Sanitária. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas-IPEC/FIOCRUZ, 2007.

de VILASBOAS e SANTOS, D. I.; GIL, E. de S. **Fluorimetria na análise farmacêutica: uma revisão**. Revista Eletrônica de Farmácia, Vol. VII (1), 24-38, 2010.

FERREIRA, F. N.; MONTEIRO, M. I. C.; da SILVA, L. I. D. **Determinação de nitrogênio total em amostras de rocha petrolífera pelo método Kjeldahl/Indofenol**. I Jornada do Programa de Capacitação Interna - CETEM, 2001.

FIOCRUZ. Agência Fiocruz de Notícias. Leishmaniose. 2013. Acesso em: 26 jan. 2023. Disponível em : <<https://agencia.fiocruz.br/leishmaniose>>.

GOMES, C. M. et al. **Complementary exams in the diagnosis of american tegumentary leishmaniasis.** An. Brasileiro de Dermatologia, p. 701-709, set-out. 2014.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A . L. Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, vol. 26. jun. 2012.

HANDLER, M. Z. et al. **Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis Differential diagnosis, diagnosis, histopathology, and management: Differential diagnosis, diagnosis, histopathology, and management.** J. Am. Acad. Dermatol, v. 73, n. 6, p. 911-926, dez. 2015.

LÉVÊQUE, M. F. et al. Place of Serology in the Diagnosis of Zoonotic Leishmaniasis With a Focus on Visceral Leishmaniasis Due to *Leishmania infantum*. **Frontiers**, v. 10, n. 67, 25 fev. 2020.

MANN, S. et al. **A Review of Leishmaniasis: Current Knowledge and Future Directions.** Current Tropical Medicine Reports. 2021

MATTOS, M. da S. **Abordagem e Tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana na Atenção Básica.** Universidade Federal do Paraná (UFSC), Núcleo de Telessaúde Santa Catarina. Florianópolis – SC, 2017.

MIWA, A. C. P.; FALCO, P. B.; CALIJURI, M. C. **Avaliação de métodos espectrofotométricos para determinação de proteína em amostras de lagoas de estabilização.** Eng. sanit. ambient. Vol.13 - nº 2 - abr/jun 2008.

OMS. **Doenças Tropicais Negligenciadas.** 2022. Acesso em: 26 jan. 2022. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/neglected-tropical-diseases>>.

OPAS. **Informe epidemiológico das américas.** 2021.

OPAS. **OMS lança plano de 10 anos para acabar com sofrimento causado por doenças tropicais negligenciadas.** 2021. Acesso em: 7 jul 2022. Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/noticias/29-1-2021-oms-lanca-plano-10-anos-para-acabar-com-sofrimento-causado-por-doencas-tropicais>>.

PASSOS, J. P. da S. **Padronização do Método de Produção de Antígeno de Montenegro.** Dissertação em Vigilância Sanitária, Programa. Pós – Graduação em Vigilância Sanitária. Bio-Manguinhos, FIOCRUZ / INCQS / FIOCRUZ, 2004.

QUBIT. Informe técnico, Qubit® fluorometers and assays. 2021. Acesso em: 26 jan. 2023. Disponível em : <<http://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/BID/brochures/qubit-fluorometers-assays-brochure.pdf>>

QUBIT. Manual de Instruções, Qubit® Protein Assay Kits. fev. 2015. Acesso em: 26 jan. 2023. Disponível em : <[https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/Qubit\\_Protein\\_Assay\\_UG.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/Qubit_Protein_Assay_UG.pdf)>.

SALMAN, A. K. D. [et al]. **Metodologias para avaliação de alimentos para ruminantes domésticos.** Embrapa, Porto Velho - RO, mai. 2010.

Secretaria da Saúde. Governo do Estado do Paraná. CPPI - Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos. Acesso em: 26 jan. 2023. Disponível em : <<https://www.saude.pr.gov.br/Pagina/CPPI-Centro-de-Producao-e-Pesquisa-de-Imunobiologicos>>.

SOTOMAYOR, M. D. P. T. Aplicação e avanços da espectroscopia de luminescência em análises farmacêuticas. **Química. Nova**, Vol. 31, No. 7, 1755-1774, 2008.

SZARGIKI, R. **Comparação de métodos diagnósticos em leishmaniose tegumentar americana.** Dissertação (Mestrado) — Universidade Federal do Paraná, 2005.

TOLEDO, M. M. Ações de saúde e geração de conhecimento nas ciências médicas 3. 2020.

VASCONCELOS, J. M. et al. American integumentary leishmaniasis: epidemiological profile, diagnosis and treatment. **Rev. Bras. Anal. Clin.**, v. 50, n. 3, p. 221–7, 2018.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, 21. 1998.