

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CRISTIANE ZOCATELLI RIBEIRO

COMPOSIÇÃO MULTIEPITÓPICA DE PROTEÍNAS DE *MYCOBACTERIUM*
LEPRAE COMO FERRAMENTA IMUNOCROMATOGRÁFICA E ELETROQUÍMICA
PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS SÉRICOS DE PACIENTES COM
HANSENÍASE

CURITIBA

2024

CRISTIANE ZOCATELLI RIBEIRO

COMPOSIÇÃO MULTIEPITÓPICA DE PROTEÍNAS DE *MYCOBACTERIUM*
LEPRAE COMO FERRAMENTA IMUNOCROMATOGRÁFICA E ELETROQUÍMICA
PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS SÉRICOS DE PACIENTES COM
HANSENÍASE

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Juliana Ferreira de Moura

Coorientadora: Dra. Camila dos Anjos Proença

CURITIBA

2024

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Ribeiro, Cristiane Zocatelli

Composição multiepitópica de proteínas de *Mycobacterium leprae* como ferramenta imunocromatográfica e eletroquímica para detecção de anticorpos séricos de pacientes com hanseníase / Cristiane Zocatelli Ribeiro. – Curitiba, 2024.

1 recurso on-line : PDF.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Juliana Ferreira de Moura.

Coorientadora: Dra. Camila dos Anjos Proença.

1. Hanseníase. 2. Diagnóstico clínico. 3. Técnicas biossensoriais. 4. Cromatografia de afinidade. 5. Epitopos. I. Moura, Juliana Ferreira de, 1975-. II. Proença, Camila dos Anjos. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia. IV. Título.

Bibliotecária: Giana Mara Seniski Silva. CRB-9/1406

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação MICROBIOLOGIA, PARASITOLOGIA E PATOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **CRISTIANE ZOCATELLI RIBEIRO** intitulada: **Composição multieptóptica de proteínas de *Mycobacterium leprae* como ferramenta imunocromatográfica e eletroquímica para detecção de anticorpos séricos de pacientes com hanseníase**, sob orientação da Profa. Dra. JULIANA FERREIRA DE MOURA, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutora está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 28 de Junho de 2024.

Assinatura Eletrônica

05/07/2024 14:41:35.0

JULIANA FERREIRA DE MOURA
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

27/07/2024 08:09:26.0

PAULO ROBERTO DE OLIVEIRA
Avaliador Externo (INSTITUTO SENAI DE INOVAÇÃO EM
ELETROQUÍMICA)

Assinatura Eletrônica

16/07/2024 11:49:32.0

BRENO CASTELLO BRANCO BEIRÃO
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

30/07/2024 16:53:11.0

VANIA NIETO BRITO DE SOUZA
Avaliador Externo (INSTITUTO LAURO DE SOUZA LIMA)

Assinatura Eletrônica

16/07/2024 12:01:51.0

ALESSANDRA BECKER FINCO
Coordenador(a) Pós-Doc (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

02/08/2024 17:16:41.0

CAMILA DOS ANJOS PROENÇA
Coordenador(a) (INSTITUTO SENAI DE INOVAÇÃO EM
ELETROQUÍMICA)

Dedico esta tese a todos os pesquisadores que vieram antes de mim e cujos trabalhos e dedicação tornaram este estudo possível. Agradeço aos que lançaram as bases do conhecimento em que me baseei, aos que abriram as portas para novas pesquisas e aos que me inspiraram com sua dedicação à ciência.

AGRADECIMENTOS

“A gratidão é um sentimento que nos conecta ao que há de mais nobre na vida. Ela nos capacita a reconhecer e valorizar as dádivas que nos cercam, desde os gestos simples de gentileza até as bênçãos mais extraordinárias”. Assim começo, com o coração cheio de gratidão a agradecer especialmente a minha família, pela paciência e apoio incondicional, aos amigos e amigas do PPG em Microbiologia, Parasitologia e Patologia da Universidade Federal do Paraná, do laboratório de Biossensores Eletroquímicos e Moleculares do Instituto Senai de Inovação em Eletroquímica, e da vida, cujo apoio, incentivo e torcida foram fundamentais. Suas valiosas contribuições estão entrelaçadas em cada página desta tese, e espero sinceramente que, ao ler estas linhas, cada um de vocês se reconheça nessa jornada compartilhada.

Gostaria de destacar algumas pessoas que desempenharam papéis primordiais no meu percurso rumo ao doutoramento. Começou com um e-mail e uma conversa com o Dr. Luiz Carlos Ferracin, cujo ouvido atento, incentivo e suporte foram essenciais. O Dr. Paulo Roberto Dantas Marangoni, pesquisador e egresso da Universidade Federal do Paraná, que não apenas me auxiliou na construção do projeto, juntamente com a Camila Rizzardi Peverari, mas também me apresentou à professora Dra. Juliana Ferreira de Moura, minha orientadora. A Dra. Juliana não apenas me acolheu e apoiou, mas também me concedeu uma oportunidade única. Mesmo ciente dos desafios que eu enfrentava ao conciliar família, trabalho e estudo, ela esteve ao meu lado com seu apoio incondicional, orientação precisa e conselhos valiosos. Sua dedicação, amizade e comprometimento foram fundamentais para o meu desenvolvimento acadêmico e pessoal ao longo deste caminho. Sou imensamente grata por toda a sua generosidade e confiança em mim. A vocês, minha eterna gratidão.

Não poderia deixar de mencionar minha coorientadora, Dra. Camila dos Anjos Proença, que além de uma grande amiga, foi uma fonte constante de ensinamentos e auxílio em todas as etapas, sempre com generosidade, respeito e delicadeza. Agradeço também a professora Dra. Larissa Magalhães de Alvarenga, pelo apoio, parceria, orientações e conselhos. Aninha, minha companheira de experimentos, obrigada por tudo.

Agradeço a Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela bolsa concedida durante a pandemia da COVID-19; à Universidade Federal do Paraná e ao Instituto Senai de Inovação em Eletroquímica pela oportunidade de pesquisa.

Em profunda reverência, elevo meus pensamentos em gratidão pela divina luz que guiou meus passos nesta jornada. Agradeço pelas bênçãos recebidas, pelas provações que me fortaleceram e pela fé que me impulsionou a seguir em frente.

"Você não pode esperar construir um mundo melhor sem melhorar os indivíduos. Para esse fim, cada um de nós deve trabalhar para o seu próprio aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, compartilhar uma responsabilidade geral por toda a humanidade."

Marie Curie, 1933

RESUMO

A hanseníase, causada pelo *Mycobacterium leprae*, permanece um significativo problema de saúde global, particularmente em regiões em desenvolvimento. A meta internacional é eliminar a hanseníase como problema de saúde pública, focando na detecção precoce e no tratamento eficaz para interromper a transmissão e prevenir deformidades. Este estudo explora duas metodologias promissoras para o diagnóstico da hanseníase utilizando três epítomos imunodominantes de proteínas e *M. leprae* conjugados à proteína KLH de forma a se manter a especificidade e aumentar a sensibilidade da detecção de anticorpos séricos. A primeira metodologia corresponde a um biossensor eletroquímico no qual nanotubos de carbono foram modificados com os epítomos sintéticos carregados, cuja presença do anticorpo específico causa interferência na recepção de elétrons provenientes do ácido ferrocenocarboxílico e consequentemente na formação de corrente. Empregando eletrodos de baixo custo, ao custo aproximado de US\$ 0,10, este biossensor apresentou uma sensibilidade de 50% e uma especificidade de 90% na coorte testada, caracterizando-se pelo ineditismo na aplicação de nanotubos de carbono de parede múltipla na modificação de eletrodos para o diagnóstico de uma doença negligenciada, destacando-se, portanto, o potencial inovador dessa tecnologia. O segundo método foi baseado em um imunoensaio cromatográfico (LFIA) empregando nanopartículas de ouro decoradas com a mesma composição multiepitópica mencionada acima. Os resultados indicam que este teste foi capaz de detectar pacientes multibacilares e paucibacilares com 91,67% de sensibilidade e 95,45% de especificidade, características que o evidenciam como um promissor aliado na detecção precoce de casos e na busca ativa por infectados. Este método é simples, rápido e de baixo custo (US\$ 0,05/tira), ou seja, adequado para uso em áreas endêmicas e com poucos recursos. Ambas as tecnologias são de grande importância em saúde pública, uma vez que a especificidade dos métodos está relacionada ao emprego de epítomos sintéticos de determinado agente etiológico, nesse caso, de proteínas de *M. leprae*, mas que podem ser aplicadas a qualquer outra infecção em que seja possível a detecção de anticorpos, alterando-se somente o peptídeo alvo. Por fim, espera-se que este estudo possa contribuir, de alguma forma, com os esforços globais de controle da transmissão da hanseníase para que possamos almejar a erradicação da doença.

Palavras-chave: Hanseníase; diagnóstico; biossensor eletroquímico; imunocromatografia; epítomos sintéticos.

ABSTRACT

Leprosy, caused by *Mycobacterium leprae*, remains a significant global health problem, particularly in developing regions. The international goal is to eliminate leprosy as a public health problem by focussing on early detection and effective treatment to interrupt transmission and prevent deformities. This study explores two promising methodologies for the diagnosis of leprosy using three immunodominant epitopes of *M. leprae* proteins conjugated to the KLH protein to maintain specificity and increase the sensitivity of serum antibody detection. The first method is an electrochemical biosensor in which carbon nanotubes have been modified with synthetic epitopes coupled to KLH and the presence of specific antibodies to coupled peptides causes interference in the reception of electrons from ferrocenecarboxylic acid and consequently in the current. Using disposable, low-cost electrodes, this biosensor, at a cost of approximately US\$0,10, showed a sensitivity of 50% and a specificity of 90% in the cohort tested. Its unprecedented application of multi-walled carbon nanotubes in the modification of electrodes for the diagnosis of a neglected disease highlights the innovative potential of this technology. The second method was based on a chromatographic immunoassay (LFIA), it employs gold nanoparticles decorated with the same multiepitopic composition mentioned above. The results indicate that this test was able to detect multibacillary and paucibacillary patients with 91,67% sensitivity and 95,45% specificity, interesting features of a promising test to the early detection of cases and in the active search for infected people. This method is simple, fast and low-cost, (US\$ 0,05/strip) suitable for use in endemic areas with few resources. Both technologies are of great importance in public health, since the specificity of the methods is related to the use of synthetic epitopes of a particular etiological agent, in this case *M. leprae* proteins, but they can be applied to any other infection, in which antibody detection is possible, by changing the target peptide. Finally, it is hoped that this study can contribute in some way to global efforts to control the transmission of leprosy so that we can aim to eradicate the disease.

Keywords: Leprosy; diagnosis; electrochemical biosensor; chromatographic immunoassay; synthetic peptides.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - MONTAGEM DE UMA TIRA IMUNOCROMATOGRÁFICA	44
FIGURA 2 - ESQUEMA ILUSTRATIVO DA FABRICAÇÃO DE UMA CÉLULA ELETROQUÍMICA DESCARTÁVEL	47
FIGURA 3 - PRIMEIRA ETAPA DE FABRICAÇÃO DO DISPOSITIVO ELETROQUÍMICO	55
FIGURA 4 - SEGUNDA ETAPA DE FABRICAÇÃO DO DISPOSITIVO ELETROQUÍMICO	56
FIGURA 5 - ETAPAS DE MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE DO ELETRODO DE TRABALHO	59
FIGURA 6 - MONTAGEM DE UMA TIRA IMUNOCROMATOGRÁFICA	65
FIGURA 7 - ESPECTRO RAMAN DOS MWCNT	68
FIGURA 8 - IMAGENS RAMAN DOS MWCNT	68
FIGURA 9 - IMAGEM MEV DO ELETRODO DE CARBONO SEM METALIZAÇÃO E COM METALIZAÇÃO PELO TÉCNICA DE <i>SPUTTERING</i>	69
FIGURA 10 - IMAGEM MEV DO ELETRODO APÓS A DEPOSIÇÃO DO CS- MWCNT SEM METALIZAÇÃO E COM METALIZAÇÃO PELO TÉCNICA DE <i>SPUTTERING</i>	70
FIGURA 11 - PREPARAÇÃO DO <i>CONJUGATE PAD</i>	92
FIGURA 12 - AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE AUNP E IMUNOGLOBULINA G – MURINO E ANTI MURINA NOS TESTES 1 E 2	93
FIGURA 13 - AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE AUNP E IgG MURINA E ANTI IgG MURINA NOS TESTES 3 E 4	94
FIGURA 14 - INTERAÇÃO ELETROSTÁTICA ENTRE NANOPARTÍCULA DE OURO E POOL DE PEPTÍDEOS (21 E 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	95
FIGURA 15 - ILUSTRAÇÃO DE TESTE POSITIVO E NEGATIVO	96
FIGURA 16 - CONFIGURAÇÃO DO LFIA APÓS A PADRONIZAÇÃO E APLICAÇÃO COM AMOSTRAS REAIS	99
FIGURA 17 - TESTE COM AMOSTRA REAL DE PACIENTES CONTROLE NEGATIVOS	100
FIGURA 18 - TESTE COM AMOSTRA REAL DE PACIENTES POSITIVOS (PB E MB)	101

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - ESTUDO DE VOLTAMETRIA CÍCLICA ETAPA POR ETAPA – CARBONO E CS-MWCNT	72
GRÁFICO 2 - VOLTAMETRIA CÍCLICA ETAPA POR ETAPA – PEPTÍDEOS CARREADOS E BSA.....	73
GRÁFICO 3 - AVALIAÇÃO DO TEMPO DE INTERAÇÃO DOS PEPTÍDEOS.....	75
GRÁFICO 4 - AVALIAÇÃO DA DILUIÇÃO DAS AMOSTRAS	77
GRÁFICO 5 - POOL DE PEPTÍDEOS X POOL DE PEPTÍDEO CARREADO CONTRA AMOSTRAS NEGATIVAS, PB E MB	79
GRÁFICO 6 - ESTUDO DE CONCENTRAÇÃO DO PEPTÍDEO CARREADO	80
GRÁFICO 7 - OTIMIZAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA Sonda REDOX FCA.....	81
GRÁFICO 8 - TEMPO DE INCUBAÇÃO DA AMOSTRA	82
GRÁFICO 9 - REPETIBILIDADE DOS ELETRODOS SEM MODIFICAÇÃO E COM MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE	83
GRÁFICO 10 - AMOSTRAS CLASSIFICADAS PELO TESTE DE TUKEY COM 95% DE CONFIANÇA.....	86
GRÁFICO 11 - CURVA ROC	87
GRÁFICO 12 - FORMAÇÃO DA AUNP OBSERVADA NO NANOESPECTROFOTÔMETRO	89
GRÁFICO 13 - DISTRIBUIÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS POR TAMANHO.....	90
GRÁFICO 14 - INTENSIDADE CALCULADA DAS AMOSTRAS EM PIXEL.....	102
GRÁFICO 15 - CURVA ROC LATERAL FLOW	103
GRÁFICO 16 - CUT-OFF DO TESTE DE LATERAL FLOW	103

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - TESTE DE TUKEY COM 95% DE CONFIANÇA.....	85
TABELA 2 - DESENHO EXPERIMENTAL DA OTIMIZAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE IgG E AuNP.....	91
TABELA 3 - CONDIÇÕES AVALIADAS NO LATERAL FLOW	97

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

a.C.	- antes de Cristo
Ab	- Anticorpo
Ag	- Antígeno
Ag85	- Antígeno da família 85
ANOVA	- Análise de Variância
ANS	- Avaliação Neurológica Simplificada
AUC	- Área Sob a Curva (do inglês, <i>Area Under the Curve</i>)
AuNP	- Nanopartícula de ouro
BCG	- Vacina Bacillus Calmette-Guérin
BL	- Borderline Lepromatosa
BSA	- Albumina Sérica Bovina (do inglês, <i>Bovine Serum Albumin</i>)
BT	- Borderline Tuberculoide
CNT	- Nanotubo de carbono (do inglês, <i>Carbon Nanotube</i>)
COVID-19	- Doença por Coronavírus 2019 (do inglês, <i>Coronavirus disease 2019</i>)
CS	- Quitosana (do inglês, <i>Chitosan</i>)
D	- Dimorfo
D.O.	- Densidade Ótica
DLS	- Espalhamento Dinâmico de Luz (do inglês, <i>Dynamic Light Scattering</i>)
DNA	- Ácido desoxirribonucleico (do inglês, <i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
DTN	- Doença tropical negligenciada
ELISA	- Ensaio Imunoenzimático por Ligação de Anticorpos (do inglês, <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
ENH	- Eritema Nodoso Hansênico
ENMG	- Eletroneuromiograma
FCA	- Ácido ferroceno monocarboxílico (do inglês, <i>Ferrocenecarboxylic acid</i>)
Fmoc	- <i>Fluorenylmethyloxycarbonyl</i>
GIF	- Grau de Incapacidade Física
HEMEPAR	- Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná
I	- Indeterminado
IB	- Índice Baciloscópico
ICST	- Imunoensaio em formato de tira cromatográfica (do inglês, <i>Immuno-chromatographic Strip Test</i>)

IFN-γ	- Interferon-gamma
IgG	- Imunoglobulina classe G
IgM	- Imunoglobulina classe M
IL	- Interleucina
iNOS	- Óxido nítrico sintase induzível (do inglês, <i>Inducible Nitric Oxide Synthase</i>)
LAM	- Lipoarabinomano
LC	- Linha controle
LFIA	- Imunoensaio de Fluxo Lateral (do inglês, <i>Lateral Flow Immunochromatographic Assay</i>)
LID-1	- <i>Leprosy IDRI Diagnostic 1</i>
LL	- Lepromatoso-lepromatoso
LT	- Linha teste
MB	- Multibacilar
MWCNT	- Nanotubo de Carbono de Parede Múltipla (do inglês, <i>Multi-Walled Carbon Nanotube</i>)
NDO-LID	- <i>Natural Disaccharide Octyl – Leprosy IDRI Diagnostic 1</i>
NP	- Nanopartícula
ODS	- Objetivos de Desenvolvimento Sustentável
OMP	- Mãos, Olhos e Pés
OMS	- Organização Mundial da Saúde
PB	- Paucibacilar
PBS	- Tampão salina fosfato (do inglês, <i>Phosphate-Buffered Saline</i>)
PCR	- Reação de cadeia em polimerase (do inglês, <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PEG	- Polietilenoglicol
PGL	- Glicolípido Fenólico (do inglês, <i>Phenolic Glycolipid</i>)
PoCT	- Teste no Ponto de Atendimento (do inglês, <i>Point-of-Care Testing</i>)
qPCR	- Reação de cadeia em polimerase em tempo real (do inglês, <i>quantitative Polymerase Chain Reaction</i>)
RDT	- Teste de Diagnóstico Rápido (do inglês, <i>Rapid Diagnostic Test</i>)
RE	- Eletrodo de referência (do inglês, <i>Reference Electrode</i>)
ROC	- Característica de Operação do Receptor (do inglês, <i>Receiver Operating Characteristic</i>)

rpm	- Rotações por minuto (do inglês, <i>rotations per minute</i>)
RSD	- Desvio Padrão Relativo (do inglês, <i>Relative Standard Deviation</i>)
SAM	- Monocamada Auto-organizada (do inglês, <i>Self-Assembled Monolayer</i>)
SNP	- Polimorfismos de Nucleotídeo Único (do inglês, <i>Single Nucleotide Polymorphisms</i>)
SPCE	- Eletrodo de Carbono Serigrafado (do inglês, <i>Screen-Printed Carbon Electrode</i>)
SPR	- Ressonância de Plasmons de Superfície (do inglês, <i>Surface Plasmon Resonance</i>)
SUS	- Sistema Único de Saúde
TGF- β	- Fator de Crescimento Transformador beta (do inglês, <i>Transforming Growth Factor beta</i>)
Th	- Linfócito T auxiliar (do inglês, <i>lymphocyte T helper</i>)
TLR	- Receptor Toll-Like, (do inglês, <i>Toll-Like Receptor</i>)
TNF- α	- Fator de necrose tumoral alfa (do inglês, <i>Tumor Necrosis Factor alpha</i>)
TT	- Tuberculóide-tuberculóide
VV	- Virchowiana
WE	- Eletrodo de trabalho (do inglês, <i>Working Electrode</i>)
WHO	- <i>World Health Organization</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

α - alfa

β - beta

μ - micro

γ - gama

$\geq$ - maior ou igual

π – pi

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	10
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE GRÁFICOS	12
LISTA DE TABELAS	13
LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS.....	14
SUMÁRIO	18
1 INTRODUÇÃO	23
1.1 OBJETIVOS	26
1.1.1 Objetivo geral	26
1.1.2 Objetivos específicos.....	26
2 REVISÃO DE LITERATURA	28
2.1 A ORIGEM DA DOENÇA E IDENTIFICAÇÃO DO BACILO DA HANSENÍASE..	28
2.2 ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS	32
2.3 EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA.....	34
2.4 ELIMINAÇÃO DA HANSENÍASE	35
2.5 DIAGNÓSTICO DA HANSENÍASE	36
2.5.1 Avaliação neurológica simplificada (ANS)	37
2.5.2 Baciloscopia	38
2.5.3 Histopatologia.....	39
2.5.4 Ultrassom de nervos periféricos	39
2.5.5 Eletroneuromiograma	40
2.5.6 Teste imunocromatográfico	40
2.5.7 Testes de biologia molecular.....	40
2.6 IMUNOENSAIO E IMUNOSSENSORES	41
2.7 DISPOSITIVOS ELETROQUÍMICOS DE BAIXO CUSTO	46
2.8 NANOMATERIAIS COMO MODIFICADORES	48
2.9 BIOMARCADORES NA HANSENÍASE.....	49
2.10 PEPTÍDEOS SINTÉTICOS	50
3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL – ELETROQUÍMICO	53
3.1 REAGENTES E SOLUÇÕES	53
3.2 INSTRUMENTAÇÃO E MATERIAL	54

3.3 FABRICAÇÃO DO DISPOSITIVO ELETROQUÍMICO	54
3.4 PREPARO DA SOLUÇÃO DE NANOTUBOS DE CARBONO DE PAREDES MÚLTIPLAS (MWCNT)	56
3.5 CARACTERIZAÇÃO RAMAN DO MWCNT E CS-MWCNT	57
3.6 CARACTERIZAÇÃO POR MICROSCOPIA DE VARREDURA.....	57
3.7 CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DO BIOSSENSOR.....	57
3.8 MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE ELETRÓDICA DA CÉLULA ELETROQUÍMICA DESCARTÁVEL COM NANOESTRUTURA DE CARBONO E PEPTÍDEOS SELETIVOS	58
3.9 AMOSTRAS BIOLÓGICAS	59
3.10 AVALIAÇÃO DE PEPTÍDEOS SINTÉTICOS BASEADOS EM EPÍTOPOS LINEARES E CONFORMACIONAIS.....	60
3.11 CONJUGAÇÃO DOS PEPTÍDEOS NA PROTEÍNA CARREADORA KLH.....	60
3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA	61
4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL – LATERAL FLOW IMMUNOASSAY (LFIA)	
62	
4.1 REAGENTES E SOLUÇÕES	62
4.2 INSTRUMENTAÇÃO E MATERIAL	62
4.3 SÍNTESE QUÍMICA DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO	62
4.4 CARACTERIZAÇÃO DA AUNP POR ESPECTROFOTÔMETRO	63
4.5 CARACTERIZAÇÃO DA AUNP POR ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO (DLS) 64	
4.6 CONJUGAÇÃO DO POOL DE PEPTÍDOS CARREADOS ÀS NANOPARTÍCULADAS DE OURO.....	64
4.7 MONTAGEM DAS TIRAS DE IMUNOCROMATOGRRAFIA.....	65
4.8 AMOSTRAS BIOLÓGICAS	66
4.9 LEITURA DAS TIRAS	66
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	66
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO – ELETROQUÍMICO	67
5.1 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DO ELETRODO DE TRABALHO MODIFICADO	67
5.1.1 Espectroscopia Raman	67
5.1.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	69

5.2 AVALIAÇÃO DE CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS E CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA ETAPA POR ETAPA DAS MODIFICAÇÕES DO ELETRODO DE TRABALHO	71
5.3 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS EXPERIMENTAIS	74
5.3.1 Otimização do tempo de conjugação do peptídeo	74
5.3.2 Diluição das amostras de soro	75
5.3.3 Caracterização eletroquímica do <i>pool</i> de peptídeos vs <i>pool</i> de peptídeos carreados	78
5.3.4 Avaliação da concentração de peptídeos carreados	79
5.3.5 Otimização da concentração da sonda redox FCA utilizada no imunoensaio ..	80
5.3.6 Tempo de incubação da amostra	81
5.4 REPETIBILIDADE DO BIOSENSOR	82
5.5 AVALIAÇÃO DO IMUNOSENSOR NA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS EM AMOSTRAS DE PACIENTES.....	83
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO – LATERAL FLOW IMMUNOASSAY	89
6.1 CARACTERIZAÇÃO DA AUNP	89
6.1.1 Caracterização óptica por espectrofotometria de UV-Vis	89
6.1.2 Caracterização da AuNP por espalhamento dinâmico de luz (DLS)	90
6.2 OTIMIZAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE AUNP E DO ANTICORPO.....	91
6.2.1 Otimização da concentração do anticorpo anti IgG murina – linha controle.....	91
6.2.2 Otimização das condições do ensaio	95
6.3 AVALIAÇÃO DO LFIA COM AMOSTRAS REAIS	98
6.4 QUANTIFICAÇÃO DOS TESTES COLORIMÉTRICOS.....	101
6.5 CURVA ROC.....	102
7 CONCLUSÕES	104
7.1 PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS	105
8 REFERÊNCIAS.....	107

1 INTRODUÇÃO

A Organização Mundial de Saúde (OMS), estima que um sexto da população mundial esteja infectado por uma ou mais doenças tropicais negligenciadas (DTN), o equivalente a mais de um bilhão de pessoas (WHO, 2023). Essas doenças são prevalentes em países em desenvolvimento com clima tropical, onde se propagam com maior facilidade e persistem ao longo dos anos. Infelizmente, por estarem localizadas em áreas remotas e sem infraestrutura sanitária básica, as pessoas afetadas por essas doenças são frequentemente ignoradas (WHO, 2023).

A hanseníase está no rol dessas doenças e, ainda, é um grave problema de saúde global devido à sua ampla distribuição geográfica, alta incidência e manifestações clínicas com consequentes lesões e mutilações graves e permanentes. Essa doença tem como agentes etiológicos os bacilos *Mycobacterium leprae* e *Mycobacterium lepromatosis*, ambos com capacidade de infectar nervos periféricos – principalmente as células de Schwann, olhos e pele. Isso leva à perda de sensibilidade, causando dor, lesões cutâneas, paralisia dos nervos e alto poder incapacitante (BRASIL, 2017, 2020a).

Em 2019, antes da pandemia global da COVID-19, foram reportados mais de 200 mil novos casos no mundo e mais da metade deles foram registrados na Índia, seguido pelo Brasil (14%) e Indonésia (9%) (WHO, 2021a). Nesse mesmo ano, no Brasil, foram registrados quase 30 mil novos casos, sendo 6% registrados em crianças e adolescentes menores de 15 anos (BRASIL, 2020b).

O diagnóstico tardio traz complicações irreversíveis, principalmente quando atinge crianças e adolescentes (BRASIL, 2018, 2020a). O diagnóstico da hanseníase se baseia em diversos fatores, incluindo histórico epidemiológico, sinais clínicos, sintomas e exame das lesões, teste de sensibilidade térmica, dolorosa e tátil, além do teste de baciloscopia (MOURA et al., 2013). O tratamento da hanseníase no Brasil é disponibilizado gratuitamente pelo Sistema Único de Saúde (SUS). Quando a doença é diagnosticada precocemente e o tratamento com a poliquimioterapia é iniciado, é possível alcançar a remissão da enfermidade (BRASIL, 2017).

As estratégias globais para eliminação da hanseníase de 2016-2020 (WHO, 2016) e 2021-2030 (WHO, 2021) continuam focando na interrupção da transmissão da doença nos países com alta prevalência da doença. As recomendações visam promover a equidade e a justiça social, com destaque para a inclusão de pessoas

afetadas pela doença, a redução do estigma e da discriminação, a construção de parcerias e coalizões entre partes interessadas e o fortalecimento da propriedade e comprometimento dos países no combate à hanseníase (WHO, 2021b).

A persistência desse desafio global reforça a necessidade contínua de esforços para facilitar o diagnóstico precoce e eficaz da hanseníase, um imperativo para os profissionais de saúde em todo o mundo. No sistema público de saúde do Brasil, o diagnóstico positivo da hanseníase é baseado na presença de lesões na pele ou áreas com perda da sensibilidade térmica, espessamento do nervo periférico associada a alteração sensitiva e/ou na presença do *M. leprae*, confirmada na baciloscopia de esfregaço intradérmico ou na biópsia de pele (BRASIL, 2022a).

A baciloscopia é um teste acessível, ofertado nas unidades de saúde do Brasil. No entanto, tem havido uma crescente perda de expertise em muitas dessas unidades básicas. Embora o exame seja tecnicamente simples, sua precisão pode ser afetada por fatores como a coleta e fixação inadequadas, o uso incorreto de corantes e a falta de profissionais qualificados para a leitura adequada dos resultados. É importante ressaltar, que o resultado negativo da baciloscopia, não descarta o diagnóstico da doença, uma vez que pacientes classificados como paucibacilares podem apresentar um índice baciloscópico indetectável por esta técnica (BRASIL, 2010a).

Para o diagnóstico complementar da hanseníase, foram disponibilizados para o SUS, em 2022, dois testes: 1) O teste rápido imunocromatográfico que detecta imunoglobulina M (IgM) para determinação qualitativa de anticorpos anti-*Mycobacterium leprae*, indicado para os contatos intradomiciliares e 2) um teste de biologia molecular de reação em cadeia polimerase em tempo real (qPCR) para a detecção qualitativa de marcadores específicos do material genético de *Mycobacterium leprae*, em amostras de biópsia de pele ou de nervos (BRASIL, 2022b, 2022a).

Os avanços no mapeamento genético do *M. leprae* têm facilitado a detecção da bactéria em infecções subclínicas e lesões paucibacilares. O uso do material genético para diagnósticos mais precisos e detecção precoce da hanseníase é promissor. No entanto, a sensibilidade da técnica pode gerar resultados falso-positivos devido à presença de sequências genéticas similares em outras espécies de *Mycobacterium*. O custo elevado aliado a restrição dos centros de referência, são obstáculos mais relevantes, além disso, o baixo índice baciloscópico em casos

paucibacilares pode limitar o diagnóstico baseado em PCR, sugerindo a necessidade de aprimoramento contínuo dos métodos moleculares (BRASIL, 2022a).

É essencial que a população esteja atenta aos sinais da doença e busque atendimento médico imediatamente. Além disso, é fundamental que as unidades de saúde disponham de profissionais treinados e de equipamentos e insumos adequados para a realização do diagnóstico e do tratamento.

Peptídeos imunodominantes de proteínas de *M. leprae* são promissores para o uso em plataformas de diagnóstico. Eles podem servir como alvos antigênicos específicos, aumentando a precisão dos testes. O uso de metodologias com alta sensibilidade, como sensores eletroquímicos, oferece avanços significativos. Além disso, dispositivos imunológicos, como o *lateral flow*, são conhecidos por sua simplicidade e praticidade. Portanto, há evidências que indicam que o desenvolvimento dessas plataformas pode auxiliar de forma promissora no diagnóstico da hanseníase pelo médico (DI NARDO et al., 2021; SPENCER; BRENNAN, 2011).

Os sensores eletroquímicos são amplamente empregados e já se consolidaram como uma técnica de grande utilidade em diversas áreas, inclusive para as doenças negligenciadas, como a leishmaniose (LIBERATO et al., 2019; MARTINS et al., 2020), doença de Chagas (CORDEIRO et al., 2020), Chikungunya (GEORGE et al., 2019; NASRIN et al., 2020), dengue (PALOMAR et al., 2020; SANTOS et al., 2020), zika vírus (CASTRO et al., 2023), malária (SHARMA et al., 2011), e também na busca de marcadores tumorais e outras doenças cardiovasculares (CRAPNELL et al., 2022; YAN et al., 2018). No entanto, seu potencial ainda não foi completamente explorado no contexto do diagnóstico da hanseníase, tendo em vista do baixo número de trabalhos encontrados na literatura. Essa plataforma portátil poderia ser utilizada como apoio clínico acelerando o diagnóstico e reduzindo o sofrimento dos pacientes e, como consequência, interromper o ciclo de transmissão da doença.

Os testes rápidos como fluxo lateral ou *lateral flow* (Lateral Flow Immunoassay - LFIA), permitem a realização de diagnósticos precisos e imediatos diretamente no local de atendimento ao paciente, sem a necessidade de laboratórios complexos ou de infraestrutura sofisticada. A facilidade de uso e a rapidez dos resultados proporcionam uma tomada de decisão clínica mais ágil, melhorando significativamente a eficiência do tratamento e a gestão de doenças, especialmente em regiões remotas ou com recursos limitados. Além disso, a implementação de

testes rápidos pode reduzir custos e aumentar a capacidade de resposta em regiões hiperendêmicas, fortalecendo a saúde pública e promovendo um atendimento mais equitativo e inclusivo.

Como forma de contribuir com o diagnóstico da hanseníase, os dispositivos propostos utilizam peptídeos sintéticos identificados a partir da imunorreatividade obtida com anticorpos de pacientes cuja detecção se dá: 1) por meio de fundamentos metodológicos eletroquímicos, oferecendo um método específico e sensível para a aplicação sorológica, e 2) pela interação imunológica e resposta colorimétrica dos testes rápidos. A proposta desse trabalho, foi oferecer metodologias sensíveis e de baixo custo para o sistema público de saúde.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

O objetivo deste estudo foi desenvolver métodos de baixo custo para a detecção sorológica de anticorpos, empregando técnicas de detecção eletroquímica e imunocromatográfica, a fim de diferenciar pacientes positivos, paucibacilares e multibacilares de indivíduos saudáveis no diagnóstico da hanseníase. Para isso, foram utilizados peptídeos sintéticos imunodominantes de proteínas de *M. leprae* em uma composição multiepitópica como alvo antigênico

1.1.2 Objetivos específicos

1. Propor e produzir eletrodos modificados com nanomateriais que aumentem a sensibilidade;
2. Projetar e fabricar tiras de fluxo lateral com zonas de captura e controle bem definidas;
3. Determinar os parâmetros ótimos de operação do sensor eletroquímico (e.g., potencial de trabalho, eletrólito, tempo de incubação, entre outros);
4. Determinar as concentrações ideais de reagentes utilizado no teste de fluxo lateral (e.g., anticorpos, conjugados com ouro coloidal) para maximizar a sensibilidade e especificidade;

5. Testar o sensor eletroquímico e as tiras de fluxo lateral com amostras clínicas reais e avaliar a sensibilidade e especificidade dos testes;
6. Calcular o custo de cada uma das plataformas para os serviços de saúde.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A ORIGEM DA DOENÇA E IDENTIFICAÇÃO DO BACILO DA HANSENÍASE

A hanseníase, uma das doenças mais antigas registradas na história e apresenta vestígios que remontam a milhares de anos. Restos humanos datados de 2000 a.C. na Índia já exibiam sinais dessa condição, evidenciando sua presença desde épocas ancestrais (ROBBINS et al., 2009; SIL; DAS, 2022). A paleopatologia, ciência que investiga a história e evolução das doenças, desempenhou um papel importante ao identificar a hanseníase em restos mortais antigos, permitindo-nos traçar sua trajetória ao longo do tempo e compreender seu impacto em civilizações passadas (MATOS; SANTOS, 2013).

Há alguns anos, o estudo do genoma do *M. leprae* foi importante para elucidar a origem da doença. Para isso, foram comparados os genomas de diferentes cepas de *M. leprae* provenientes de países geograficamente distantes, como Brasil, Índia, Tailândia e Estados Unidos (MONOT et al., 2009). Esse estudo revelou que as cepas se apresentavam 99.995% genomicamente idênticas, sugerindo que a hanseníase possa ter surgido a partir de uma única linhagem clonal (MONOT et al., 2005, 2009). Isso é altamente promissor para o diagnóstico, tratamento e prevenção da doença, pois sugere que a deriva antigênica em *M. leprae* é estável e as sequências dos alvos de medicamentos devem permanecer constantes (MONOT et al., 2009).

Resultado desse estudo acima citado, foram identificados quatro grupos filogenéticos, de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), sendo SNPs 1-4 e 16 subtipos, de A-P (MONOT et al., 2005, 2009). Dessa forma, foi possível determinar que o *M. leprae* teve origem na África e se espalhou para países europeus e asiáticos, seguido de uma disseminação global por meio das rotas comerciais e migrações humanas ao longo do tempo. Esse padrão de migração foi corroborado pela análise de SNPs presentes em DNA antigo do *M. leprae* encontrado em fragmentos de cadáveres com mais de 1.500 anos de idade (MONOT et al., 2005, 2009).

A disseminação da doença seguiu os trajetos migratórios dos primeiros grupos humanos que se deslocaram da África Oriental em direção à Ásia, tendo se estabelecido, posteriormente, em regiões como a Europa Central e Oriental e a Bacia do Mediterrâneo há aproximadamente 40.000 anos (MONOT et al., 2005, 2009). O

estudo mencionado sugere que uma forma ancestral do *Mycobacterium leprae*, o agente causador da hanseníase, possa ter infectado um hospedeiro invertebrado, como um inseto, e que este invertebrado teria atuado como transmissor da doença para os humanos (MONOT et al., 2009). No entanto, é importante ressaltar que essa é apenas uma hipótese ainda não comprovada.

Já no século XIX, a hanseníase era uma doença com sinais clínicos bem definidos, mas seu agente etiológico ainda era desconhecido. Em 1868, o jovem médico norueguês Gerhard Henrik Armauer Hansen (1841 – 1912), desistiu de um trabalho promissor na costa noroeste da Noruega para enfrentar o desafio de cuidar de doentes na cidade de Bergen, no Hospital St. Jorgen, um hospital conhecido por receber pacientes hansênicos (KOBRO, 1925; IRGENS, 2002; GRZYBOWSKI et al., 2013).

O hospital era dirigido pelo médico dermatologista e hansenologista Daniel Cornelius Danielssen (1815 – 1894), responsável por estabelecer um sistema de avaliação *post-mortem* e histopatológico de pacientes acometidos, permitindo avanços na pesquisa da doença. Com a aproximação de Hansen, logo tornaram-se colaboradores e amigos (IRGENS, 2002; GRZYBOWSKI et al., 2013).

Até o século XIX acreditava-se que o “mal de Hansen”, surgia de forma espontânea ou era causada pelo contato com o solo; acreditava-se também que a doença era hereditária, ou castigo divino; também foi a associada às más condições sanitárias e promiscuidade (BECHLER, 2011; HARBOE, 1973). Entretanto, em 1869, Drognat-Landre verificou que europeus haviam contraído hanseníase no Suriname, indicando uma possível transmissão de pessoa para pessoa (HARBOE, 1973).

Em 1870, Hansen viajou para a Alemanha para estudar a hanseníase em um centro de pesquisa renomado, mas a tensão política e militar o levou a mudar para Viena. Lá, ele conheceu cientistas e artistas importantes da época, e o livro "*Natural Evolution*" de Charles Darwin mudou sua perspectiva sobre Deus e o surgimento das doenças. Quando ele retornou a Bergen em 1871, Hansen voltou com uma postura antagonista e assumiu seu papel como cientista (BECHLER, 2011).

À mercê da comprovação científica, Hansen finalmente conseguiu observar, em 1873, em material lepromatoso, uma célula com pequenos bastões, que ele sugeriu como o agente etiológico da enfermidade. Em 1868, Danielssen havia isolado de células infectadas algo que chamou de "*Brown elements*", essa comparação foi suficiente para que Hansen, mesmo sem conseguir explicar os mecanismos de

transmissão da doença, publicasse suas descobertas, em norueguês (GRZYBOWSKI; KLUXEN; PÓŁTORAK, 2014).

A teoria de transmissibilidade não foi bem aceita na comunidade científica, inclusive por Danielssen, que continuava acreditando na hereditariedade. Nos anos seguintes, os esforços foram para provar a transmissibilidade da hanseníase, levando Hansen a inocular nos olhos de uma paciente - sem seu consentimento, material lepromatoso. Esse ato antiético trouxe complicações para Hansen, além de problemas com a justiça da época, seu experimento não comprovou a transmissibilidade da doença (IRGENS, 2002; BECHLER, 2011).

No ano de 1879, um jovem médico alemão chamado Albert Neisser, assistente do mundialmente famoso médico Robert Koch, visitou o laboratório de Hansen. Durante a visita, Hansen tentou convencer Neisser de que os bastões observados eram uma bactéria e que eram a causa da doença. Para comprovar sua descoberta à comunidade científica, Hansen precisaria cumprir os requisitos dos postulados de Henle-Koch, que incluíam demonstrar a presença do bacilo em todas as amostras infectadas, cultivá-lo *in vitro* e mostrar que o bacilo cultivado poderia induzir a doença quando inoculado em humano ou animal (EVANS et al., 1976a; GRZYBOWSKI; KLUXEN; PÓŁTORAK, 2014; IRGENS, 2002).

Embora Hansen tenha falhado em cumprir os postulados, reconheceu-se que ele estava no caminho certo, e seus esforços foram importantes para a compreensão da doença. Durante a visita de Neisser, houve grande interesse na pesquisa de Hansen, o qual compartilhou informações mais recentes sobre o estudo da doença e forneceu materiais infectados para que Neisser pudesse continuar seus próprios estudos (BECHLER, 2011; EVANS et al., 1976b; IRGENS, 2002).

Com os preparados de Hansen e a ajuda de Koch, Neisser teve os meios para continuar seus estudos e atender os requisitos científicos necessários. Em pouco tempo, Neisser publicou um artigo em que afirmava ter identificado um bacilo em todas as amostras avaliadas. Embora a publicação tenha ocorrido em uma revista com circulação limitada, foi a primeira vez que a hipótese da existência de um possível agente etiológico fora apresentada com rigor científico (GRZYBOWSKI; KLUXEN; PÓŁTORAK, 2014).

A publicação de Neisser sobre a descoberta do bacilo causador da hanseníase não foi bem recebida pela comunidade científica da Noruega, que o acusou de ignorar as descobertas de Hansen. Danielssen foi fundamental no processo

de defesa de Hansen, apesar de, ao mesmo tempo ter sua teoria desacreditada. Hansen e Danielssen publicaram diversos trabalhos sobre a doença, mas o principal trabalho deles foi publicado na revista alemã *Virchow's Archiv* em 1880, quando finalmente foi atribuída e reconhecida a descoberta do bacilo e a doença passou a ser conhecida como "doença de Hansen" (BECHLER, 2011).

No ano seguinte, em 1881, Neisser publicou um artigo na mesma revista alemã e fez questão de esclarecer que nunca teve intenção de ter prioridade nos estudos da hanseníase e que renunciava ao mérito de ter sido o primeiro a descrever o bacilo com o método de coloração de Robert Koch (BECHLER, 2011).

A essa altura a hanseníase avançava em todos os continentes. Além de descobridor do bacilo, Hansen também ficou conhecido pela administração, condução e monitoramento da doença, diminuindo significativamente o número de doentes na Noruega (PANDYA, 2003). Em 1897, quase 180 hansenologistas, dermatologistas e cientistas participaram da Conferência Internacional de Berlin, o primeiro encontro para discutir soluções para a hanseníase no qual a participação de Hansen foi fundamental, momento em que atingiu o ponto alto de sua carreira científica (PANDYA, 2003).

Representando seu país e munido de anos de pesquisa com pacientes doentes e com o mérito de ser o descobridor do bacilo da hanseníase, sozinho, tinha legitimidade para propor soluções para todos os presentes, o trabalho feito na Noruega serviria como modelo para todo o mundo (IRGENS, 2002; PANDYA, 2003).

As medidas de Hansen incluíam isolamento compulsório em asilos de infectados, para todos aqueles que tiveram contato com os doentes e que não cumpriam as medidas sanitárias, como: usar camas separadas, separar as roupas de cama, não compartilhar as mesmas roupas, ou os mesmos talheres. Como consequência, observou-se o aumento do número de pessoas nesses asilos com o passar do tempo (PANDYA, 2003).

Muitos asilos foram estabelecidos, como aqueles construídos após a primeira conferência internacional sobre a doença em Berlim em 1897, ou mesmo aqueles após o primeiro congresso internacional no Cairo em 1938, mas não eram uniformes em estilo e caráter (ROBERTSON, 2009).

Oferecer asilo aos doentes e por tanto tempo resultou no isolamento forçado, estigma social e desconexão com as pessoas não infectadas; dito de outra forma, muitos pacientes de "leprosários", mesmo curados, formaram novas famílias e

permanecem ainda hoje nesses locais por incapacidade de viver fora desses espaços (WHITE; FRANCO-PAREDES, 2015).

O impacto desse isolamento forçado, é resultado do contexto da história da hanseníase e as políticas de saúde que foram adotadas ao longo do tempo. Além disso, é importante reconhecer que, infelizmente, ainda hoje existe estigma e discriminação associados à hanseníase, o que pode dificultar a reintegração social dos pacientes que se recuperaram da doença. Como tal, é indispensável trabalhar para combater esse estigma e garantir que as pessoas com hanseníase possam viver plenamente integradas na sociedade.

2.2 ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS

O *M. leprae* é um bacilo de multiplicação lenta (tempo de geração de 12 a 14 dias), que pertence ao gênero *Mycobacterium*, família *Mycobacteriaceae* e ordem *Actinomycetales*. Pode ser encontrado isolado ou em aglomerados, não possui esporos, plasmídeos ou motilidade, sendo uma bactéria aeróbica e microaerófila obrigatória (CLAPASSON; CANATA, 2012).

As micobactérias são bacilos (ou bastonetes) com comprimento médio de 2,1 micrômetros (μm) e largura entre 0,25 e 0,3 μm . Elas têm a capacidade de resistir à descoloração quando submetidas a uma solução de etanol e ácido clorídrico permanecendo coradas com carbolfucsina. Isso significa que são ácido-resistentes e essa capacidade se deve ao fato de apresentarem alto teor lipídico em sua parede celular (GILLIS, 2015).

O *M. leprae* não é cultivável em meios de cultura comumente usados em laboratórios, mas, Shepard (1960) conseguiu realizar a inoculação e multiplicação da bactéria ao injetar bacilos de *M. leprae* no coxim da pata de camundongos. Esse experimento resultou em lesão localizada e infecção generalizada em camundongos sem timo. O timo é essencial para a maturação dos linfócitos T, células-chave do sistema imunológico. Em camundongos sem timo (atímicos), a ausência desses linfócitos enfraquece a resposta imune, facilitando a disseminação do *M. leprae*. Esse modelo experimental ajudou a compreender a patogenicidade da bactéria e o desenvolvimento da hanseníase (GOULART; PENNA; CUNHA, 2002). Modelos experimentais semelhantes também foram alcançados com sucesso em tatus (VIJAYARAGHAVAN, 2009).

O *M. leprae* é uma bactéria extremamente especializada transmitida pelas vias aéreas, que pode resistir nove dias fora do corpo humano. A transmissão também foi comprovada como sendo possível por meio de transfusão de sangue, transmissão vertical e leite materno (PLOEMACHER et al., 2020; SINGH et al., 2020). O bacilo é capaz de crescer e se multiplicar dentro de macrófagos e células de Schwann, levando a perda de sensibilidade e neuropatia e em casos mais graves, incapacidades e deformidades (BRITTON; LOCKWOOD, 2004; SCOLLARD et al., 2006; VIRMOND; GRZYBOWSKI; VIRMOND, 2015). É a única micobactéria capaz de infectar os nervos periféricos além de afetar outras partes do corpo, como medula óssea, fígado, baço, gânglios linfáticos, pulmões, esôfago, rim, olhos e testículos (JOB; SANCHEZ; HASTINGS, 1985). O bacilo tem um tempo de duplicação longo, favorecido por temperaturas em torno de 30 °C, com o ótimo em 32 °C. Ele é suscetível ao calor e à luz ultravioleta, mas é resistente à ação de ácidos e álcalis. O período de incubação da doença é variável, podendo ser de algumas semanas a mais de 30 anos, mas em média, é de 2 a 5 anos para a forma tuberculóide e 9 a 11 anos para forma lepromatosa (BRASIL, 2022a; CLAPASSON; CANATA, 2012).

A parede celular do *M. leprae* é constituída principalmente por lipídios e glicolipídios, incluindo o glicolipídio fenólico 1 (PGL-1), cujo anticorpo específico é utilizado para determinar a exposição ao *M. leprae* e, por vezes, proposto como parte da avaliação diagnóstica (BÜHRER-SÉKULA et al., 2003; DUPNIK, 2020).

A patogenicidade da bactéria é baixa, o que significa que nem todas as pessoas que entram em contato com ela desenvolvem a doença. O mesmo se aplica ao *Mycobacterium lepromatosis*, uma micobactéria descrita em 2008, que, embora rara, também causa hanseníase e pode levar a sequelas graves (HAN et al., 2008; REIBEL; CAMBAU; AUBRY, 2015; SINGH et al., 2015; WHO, 2020).

A hanseníase é uma doença complexa e multifatorial, em que o bacilo modula a resposta imunológica do hospedeiro por meio de mecanismos específicos de evasão (BRASIL, 2022a; MORAES et al., 2006). Pessoas que moram ou tem contato com pacientes infectados apresentam maior chance de desenvolver a doença devido ao tempo de exposição prolongada (SANTOS et al., 2019).

Patógenos intracelulares, como o *Mycobacterium leprae*, são detectados pelo sistema imunológico inato por meio dos receptores Toll-like (TLRs) (KRUTZIK et al., 2003). Durante a infecção, linfócitos se diferenciam a partir dos linfócitos Th0, sendo as principais citocinas envolvidas nessa diferenciação a IL-2, IL-12 (Th1) e IL-4 (Th2),

que estão relacionadas ao padrão de resposta observado e, por essa razão, a doença é classificada de duas formas clínicas (DE SOUSA; SOTTO; SIMÕES QUARESMA, 2017). Na extremidade resistente da doença, encontra-se a forma tuberculóide ou paucibacilar (PB), caracterizada por uma proeminente resposta celular pró-inflamatória, em que a produção de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interferon gama (IFN- γ) ativa macrófagos e induz a expressão de óxido nítrico sintase induzível (iNOS) que destrói o bacilo devido à liberação de óxido nítrico. Assim, o crescimento do bacilo é contido, o paciente tem prognóstico bom e apresentam baixos títulos de anticorpos dificultando sua identificação por métodos sorológicos convencionais (COGEN et al., 2012; REIBEL; CAMBAU; AUBRY, 2015).

Por outro lado, na extremidade susceptível, temos a forma virchowiana ou multibacilar (MB), que é associada a um maior número de lesões com presença de macrófagos e globos espumosos. Nesse caso, há o predomínio de resposta de linfócitos Th2, que induz a produção de citocinas como IL-4, IL-10 e fator de crescimento transformador beta (TGF- β) que inativam a resposta microbicida dos macrófagos, facilitando a sobrevivência do bacilo (DE SOUSA; SOTTO; SIMÕES QUARESMA, 2017; KA et al., 2014; MODLIN, 2010). Por isso, apresentam grande quantidade de títulos detectáveis de anticorpos (GASCHIGNARD et al., 2016; LEGENDRE; MUZNY; SWIATLO, 2012; REIBEL; CAMBAU; AUBRY, 2015).

2.3 EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA

Em 2020, apenas 127 países (de 221) forneceram dados sobre a prevalência da hanseníase (WHO, 2021b). Tanto a taxa de detecção de casos de 16,4 por milhão de habitantes quanto o número de 127.396 casos relatados globalmente foram significativamente menores do que nos anos anteriores, apresentando uma redução de 37,1% em comparação com 2019 (WHO, 2021b). Além disso, a prevalência registrada da doença também apresentou uma redução de 27,7%. Essa diminuição está relacionada com a menor detecção e notificação de casos durante a pandemia de COVID-19 (WHO, 2021b).

O Brasil ocupa o segundo lugar no ranking mundial de casos de hanseníase, atrás apenas da Índia (BRASIL, 2020b). Em 2022, foram notificados 174.087 novos casos em 182 dos 221 países, com uma taxa de detecção de 21,8 casos por milhão de habitantes. Um indicador alarmante da persistência da transmissão é a alta

incidência da doença em menores de 15 anos, com 10.302 novos casos registrados no mesmo ano. Três países concentram a maior parte dos casos de hanseníase no mundo: Índia, Brasil e Indonésia, que juntos representam 78,1% de todos os novos casos notificados em 2022. Em comparação com o ano de 2021, cada país apresentou um aumento no número de casos: Índia 37,7%, Brasil com 7,2% e Indonésia com 13,3% (WHO, 2023a).

Em 2022, globalmente, 9.554 adultos e 278 crianças apresentaram grau de incapacidade física tipo 2 (GIF 2), caracterizado por deficiências visíveis nos olhos, mãos e/ou pés. Essas deformidades – como lagofalmo, ectrópio, triquíase, deformidade em garra, reabsorção óssea, atrofia muscular e feridas tróficas e/ou traumáticas – podem ter um impacto profundo na vida dos indivíduos, afetando tanto a saúde física quanto o bem-estar psicossocial (BRASIL, 2024; WHO, 2023a).

A média geral de números de pacientes com hanseníase no Brasil diminuiu nos últimos dez anos, mas ainda está distante da meta global que sugere a proporção de menos de 1 caso para cada 10.000 de habitantes (BRASIL, 2020a). Em 2022, no Brasil, a taxa de detecção foi de 9,67 casos para cada 100 mil habitantes. Treze estados brasileiros apresentam taxa de detecção classificadas como alta, muito alta e hiperendêmica (BRASIL, 2024). As regiões Nordeste, Centro-Oeste e Norte concentraram os municípios com parâmetros hiperendêmicos. Mato Grosso, Tocantins e Maranhão despontaram como os estados com as maiores taxas de detecção, registrando 66,20; 50,88 e 34,67 casos por 100 mil habitantes, respectivamente (BRASIL, 2024). Essa realidade preocupante configura um cenário de hiperendemicidade nesses locais, demandando medidas urgentes e direcionadas para conter a transmissão da doença.

2.4 ELIMINAÇÃO DA HANSENÍASE

A Estratégia Global de Hanseníase da OMS 2021-2030, foi elaborada em um processo consultivo com todos os principais líderes de Estado e reflete as mudanças no panorama epidemiológico da doença. Ao traçar um novo caminho para interromper a transmissão e alcançar zero casos autóctones, o plano se propõe a construir um futuro livre da hanseníase. Integrada à Agenda da OMS para Doenças Tropicais Negligenciadas, a estratégia se alinha aos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável

(ODS), buscando alcançar a saúde universal, reduzir as desigualdades e construir parcerias eficazes (WHO, 2021a).

O compromisso com a inclusão e o bem-estar das pessoas afetadas pela hanseníase é fundamental para o seu sucesso. Combater o estigma e a discriminação, garantir o acesso universal ao diagnóstico e tratamento eficazes, e prevenir a incapacidade física são pilares essenciais para alcançar esse objetivo (WHO, 2021a).

O atraso no diagnóstico da hanseníase surge como o principal desafio a ser superado. Investir na capacitação de profissionais de saúde, no desenvolvimento de testes rápidos e eficazes, e na conscientização da comunidade são medidas cruciais para garantir o diagnóstico precoce e o tratamento adequado. A mobilização de todos os setores da sociedade – governos, profissionais de saúde, organizações não governamentais e comunidades – é fundamental para alcançar o objetivo de eliminar a hanseníase (WHO, 2021a).

2.5 DIAGNÓSTICO DA HANSENÍASE

O Ministério da Saúde do Brasil estabelece os critérios para diagnóstico de hanseníase, os quais incluem a presença de um ou mais dos seguintes sinais cardinais da doença:

- 1) Lesões na pele com alteração de sensibilidade térmica, dolorosa e/ou tátil;
- 2) Espessamento de nervos periféricos acompanhado de alterações sensitivas, motoras e/ou autonômicas; e
- 3) Detecção do *M. leprae* por meio de baciloscopia de esfregaço intradérmico ou biópsia de pele (BRASIL, 2022a).

Depois de confirmada, a doença deve ser classificada para determinar o período de tratamento. A Classificação de Madri (1953) divide a doença em dois polos estáveis e opostos, Virchowiano (VV) e tuberculóide (TT), e em dois grupos instáveis, indeterminado (I) e dimorfo (D), que evoluem naturalmente para um dos polos (ARAÚJO, 2003).

A classificação de Ridley e Jopling se tornou amplamente utilizada por pesquisadores e médicos ao redor do mundo. Segundo essa classificação, os grupos polares são classificados como TT (tuberculóide-tuberculóide) e LL (lepromatoso-lepromatoso) e os grupos intermediários são classificados como BT (borderline-

tuberculóide), BB (borderline-borderline) e BL (borderline-lepromatoso). Essa classificação permitiu uma melhor compreensão das diferentes manifestações da doença e facilitou o tratamento com a poliquimioterapia única (PQT-U) (RIDLEY; JOPLING, 1966).

As duas classificações, de Madrid e de Ridley e Jopling são utilizadas no Brasil, mas o Ministério da Saúde, seguindo a orientação da OMS, sugere a classificação operacional de divisão em dois grupos, sendo: paucibacilar (PB) e baciloscopia negativa, pacientes com 1 a 5 lesões ou multibacilar (MB) com mais de 6 lesões (ARAÚJO, 2003; BRASIL, 2022a; REIBEL; CAMBAU; AUBRY, 2015).

Essa divisão é importante porque ajuda a determinar o período de tratamento com a PQT-U: 6 meses para PB e 12 meses para MB, utilizando a combinação de três medicamentos - rifampicina, dapsona e clofazimina. Essa associação reduz a resistência medicamentosa do bacilo, problema comum quando se utiliza apenas um medicamento, o que poderia impedir a cura da doença (BRASIL, 2017; GILLIS, 2015).

Em situações em que persistem dúvidas após o exame físico, pode-se complementar a investigação diagnóstica com testes complementares (BRASIL, 2022a).

2.5.1 Avaliação neurológica simplificada (ANS)

A Avaliação Neurológica Simplificada (ANS) é um exame crucial e obrigatório no acompanhamento da hanseníase, visando monitorar a função neural do paciente. Realizada por profissionais de saúde, a ANS consiste em uma anamnese detalhada e um exame físico minucioso, incluindo testes de sensibilidade e força muscular, além da inspeção dos olhos, mãos e pés. É realizada no diagnóstico, a cada três meses e ao final do tratamento, sendo repetida sempre que necessário, fornecendo informações cruciais sobre a evolução da doença e o impacto do tratamento nas funções neurológicas do paciente (BRASIL, 2022a).

Por meio da ANS, é possível classificar o grau de incapacidade física (GIF) do paciente, fornecendo parâmetros importantes para o tratamento e seguimento. O escore “Olhos, Mãos e Pés” (OMP) é utilizado para expressar a extensão do dano neural, facilitando a avaliação global da condição do paciente. Além de ser complementar ao diagnóstico clínico da hanseníase, a ANS é fundamental para o acompanhamento clínico, sendo os resultados registrados em formulário padronizado

para garantir um seguimento adequado do paciente e fornecer dados para a notificação do caso (LEHMAN et al., 2009).

2.5.2 Baciloscopia

É um exame que busca detectar a presença do *M. leprae* em esfregaços de raspado intradérmico e estimar a carga bacilar apresentada pelo paciente. A pesquisa do bacilo também pode ser feita por meio de colorações especiais em fragmentos de biópsia de pele, nervos, linfonodos e outros órgãos; nesses casos, a baciloscopia avalia a carga bacilar apenas no fragmento analisado. A metodologia está indicada nos casos de dúvidas no diagnóstico da hanseníase; no diagnóstico diferencial em relação a outras doenças dermatológicas ou neurológicas; nos casos de dúvidas para classificação operacional e definição do período de terapia; e nos casos suspeitos de recidiva (ULE BELOTTI et al., 2021).

O raspado intradérmico é obtido por meio de pequena incisão na pele, sendo coletado em lesões cutâneas e em sítios padronizados, como lóbulos auriculares e cotovelos. O material é corado pela técnica de Ziehl-Neelsen a frio, para preservar as condições morfotintoriais do bacilo; o número de bacilos em cada esfregaço é calculado de acordo com a escala logarítmica de Ridley, que atribui índices baciloscópicos (IB) que variam de 0 a 6+. A média dos IBs obtidos em cada esfregaço serve como estimativa da carga bacilar do paciente. Embora a baciloscopia se caracterize por alta especificidade, baixo custo e execução relativamente simples quando realizada por profissionais capacitados, o exame tem baixa sensibilidade, resultando negativo nos casos paucibacilares, o que absolutamente não exclui o diagnóstico da hanseníase (BRASIL, 2010b; URA; BARRETO, 2004).

Por outro lado, o achado de bacilos álcool-ácido resistentes em raspados intradérmicos não apenas define o diagnóstico, como classifica o paciente como multibacilar. No entanto, a interpretação da presença de bacilos no exame histopatológico não é a mesma com relação à classificação do caso, uma vez que bacilos podem ser encontrados no interior de macrófagos, em pequenas quantidades mesmo em casos paucibacilares, inclusive na hanseníase indeterminada. A profundidade da incisão, a quantidade de tecido coletado, a espessura do esfregaço e a técnica de coloração podem influenciar diretamente no resultado do teste. Por isso, a disponibilidade de profissionais capacitados e de materiais adequados são

essenciais para a realização do procedimento, assim como é crucial que o acesso ao exame seja assegurado para pacientes atendidos em todos os níveis de atenção à saúde (BRASIL, 2010b, 2022a).

2.5.3 Histopatologia

O exame histopatológico é empregado nos casos de diagnóstico indefinido da hanseníase após avaliação clínica e baciloscópica. Realizado em amostras de lesões cutâneas ou nervos periféricos, busca identificar infiltrados inflamatórios e bacilos álcool-ácido resistentes. Os resultados diferem de acordo com a classificação da doença: lesões tuberculoides geralmente apresentam granulomas epitelioides, enquanto casos virchowianos exibem histiócitos desorganizados com bacilos. A sensibilidade do exame varia entre 49% e 70%, sendo considerado útil para casos com diagnóstico clínico incerto (URA; BARRETO, 2004).

Apesar das dificuldades e da não obrigatoriedade pela OMS, o exame histopatológico é uma ferramenta importante no diagnóstico da hanseníase, auxiliando na classificação da doença, avaliação da resposta ao tratamento e confirmação de casos de recidiva. A especificidade do exame varia entre 70% e 72%, sendo acessível aos pacientes e profissionais da Atenção Especializada para garantir seu uso adequado na investigação de casos duvidosos e na condução terapêutica (FINE et al., 1986).

2.5.4 Ultrassom de nervos periféricos

A ultrassonografia de nervos periféricos é um exame complementar importante na avaliação do dano neural na hanseníase. Ela permite a visualização de alterações na textura e vascularização dos nervos, além de detectar espessamentos focais, edema intraneural e microabscessos, que podem não ser detectados pelo exame físico. A técnica é especialmente útil para avaliar nervos em áreas de difícil palpação e contribui para o diagnóstico precoce da doença, aumentando a chance de detectar o segundo sinal cardinal da hanseníase: o espessamento neural periférico (JAIN et al., 2009; VIJAYAN; WILDER-SMITH, 2018).

2.5.5 Eletroneuromiograma

O eletroneuromiograma (ENMG) é um método neurofisiológico que avalia a função dos nervos periféricos e dos músculos. Na hanseníase, o ENMG é fundamental para o diagnóstico precoce do dano neural, mesmo antes que alterações sejam detectadas pelo exame físico (VIJAYAN; WILDER-SMITH, 2018).

O exame registra a atividade elétrica dos nervos e músculos, detectando alterações na condução nervosa e na contração muscular. Na hanseníase, as alterações podem ser do tipo axonal ou desmielinizante, indicando a natureza e a extensão do dano neural (KUMAR et al., 2016; VIJAYAN; WILDER-SMITH, 2018).

2.5.6 Teste imunocromatográfico

O teste de imunocromatografia-*point-of-care*, também conhecido como lateral flow-immunochromatographic-assay (LFIA), é utilizado desde a década de 1970 e tem sido aplicado em várias áreas da saúde para detecção de biomarcadores específicos de doenças infecciosas, hormônios, proteínas e anticorpos, entre outros. A tecnologia combina a especificidade de uma reação imunológica com a eficiência da separação cromatográfica, permitindo resultados rápidos, geralmente em poucos minutos, sem necessidade de equipamentos complexos (BISHOP et al., 2019).

Os LFIA são dispositivos portáteis e de baixo custo e são comumente utilizados em áreas como saúde, agricultura e segurança alimentar. É composto por uma tira de teste, geralmente em formato de cartão, que contém zonas com diferentes reagentes. A amostra a ser analisada é aplicada na zona de amostra e migra por capilaridade através da tira. Ao longo do caminho, a amostra interage com os reagentes específicos para o analito de interesse (BISHOP et al., 2019).

2.5.7 Testes de biologia molecular

A técnica laboratorial conhecida como reação em cadeia da polimerase (PCR) é empregada para amplificar fragmentos específicos de DNA, permitindo a identificação desses fragmentos em amostras biológicas. Essa técnica utiliza sequências curtas de ácido nucleico, denominadas *primers* ou iniciadores, que são responsáveis por delinear a região do genoma a ser investigada. A PCR opera por

meio de ciclos repetidos de aquecimento e resfriamento da amostra, ativando a enzima polimerase, que catalisa a replicação contínua de cópias da sequência-alvo, resultando na produção de até bilhões de cópias em apenas algumas horas (ZHU et al., 2020).

Na década de 1990, um trabalho pioneiro utilizou a PCR para identificar sequências específicas do bacilo do *M. leprae* em amostras de sangue, linfa, cabelo, secreção nasal e biópsia de pele de pacientes infectados, detectando pela primeira vez pacientes classificados como PB (SANTOS et al., 2001). No entanto, é preciso ter cautela quanto a sensibilidade do teste, pois sequências homólogas podem estar presentes em outras espécies de *Mycobacterium-spp.* gerando resultados falso-positivo (SANTOS et al., 2001).

Vale ressaltar que mesmo em casos de hanseníase confirmados por avaliação clínica ou laboratorial, o diagnóstico baseado em PCR pode não ser viável devido à variabilidade das formas clínicas e à baixa carga do *M. leprae* em casos paucibacilares. Isso evidencia a importância de aprimorar continuamente os métodos moleculares (MARTINEZ et al., 2014).

2.6 IMUNOENSAIO E IMUNOSSENSORES

Imunossensores e imunoensaios têm ganhado destaque devido à sua alta sensibilidade, baixo custo e capacidade de miniaturização. Ambos utilizam a reação específica entre anticorpo e antígeno como princípio básico. A diferença está em como os materiais imunológicos são usados: nos imunossensores, esses materiais são fixados em um transdutor, que converte a interação imunológica em um sinal mensurável. Já nos imunoensaios, os materiais imunológicos são imobilizados em suportes sólidos passivos, como placas de microtitulação, por exemplo (HASSANPOUR; HASANZADEH, 2021; NIU et al., 2020).

Conhecido como imunossensores indiretos, após a reação entre anticorpo e antígeno, os rótulos dos nanomateriais são fixados na superfície do transdutor ou no material de suporte, permitindo a quantificação por meio da medição da atividade específica do rótulo, tornando-os muito sensíveis (HASSANPOUR; HASANZADEH, 2021; NIU et al., 2020). Os imunossensores sem rótulo (*label-free*), ou diretos, têm a capacidade de detectar as alterações químicas ou físicas diretamente da interação do

composto antígeno-anticorpo sem a necessidade de marcação (HASSANPOUR; HASANZADEH, 2021).

Essas técnicas são especialmente úteis no diagnóstico clínico e no ponto de atendimento, possibilitando a detecção de biomarcadores que muitas vezes estão presentes em níveis muito baixos. A amplificação de sinal usando reações enzimáticas e nanomateriais como nanotubos de carbono, grafeno e derivados, nanopartículas metálicas e esferas magnéticas, mostram um incremento na captura, ligação e desempenho de transdução, características desejadas para esse tipo de ensaio (NIU et al., 2020; PIRO; REISBERG, 2017; WEN et al., 2017).

Em imunossensores, o material biológico (anticorpo, peptídeo, aptâmero, etc.) é imobilizado por meio de ligações covalentes na superfície do transdutor pela ação de reticuladores, ou eletrostática, promovida pela diferença de carga, onde é formada a monocamada de automontagem (*Self-Assembled Monolayer* - SAM) (BURCU BAHADIR; KEMAL SEZGINTÜRK, 2015). A interação específica entre o antígeno e anticorpo leva a alterações eletroquímicas, como resistividade, variação na voltagem e corrente elétrica, que são respectivamente medidas por sensores eletroquímicos condumétricos, potenciométricos e amperométricos (JUSTINO; DUARTE; ROCHA-SANTOS, 2016). O imunossensor eletroquímico mais típico é o amperométrico, no qual um potencial é aplicado ao eletrodo de trabalho, associado ao eletrodo de referência, em que uma espécie eletroativa vai passar por um processo de oxidação ou redução gerando uma alteração de corrente que é proporcional a quantidade da espécie alvo presente no sistema (HASSANPOUR; HASANZADEH, 2021).

Na ausência de interação entre anticorpo e antígeno, nenhum sinal é detectado. No entanto, pode haver um pequeno sinal devido à ligação inespecífica de algumas proteínas ou antígenos à superfície do substrato. A presença de outras proteínas na amostra pode resultar em adsorção inespecífica, levando ao aumento do sinal de fundo pela adsorção aos anticorpos ou à superfície. Isso, por sua vez, reduz a sensibilidade do teste. Para evitar esse tipo de interação é necessário aplicar um agente bloqueador, como BSA (albumina sérica bovina), caseína e surfactantes como polietilenoglicol (PEG) e Tween 20 (RAPP; GRUHL; LÄNGE, 2010).

Um imunoensaio é um teste bioquímico frequentemente empregado para quantificar a presença de moléculas específicas. Esse método se baseia na interação entre um analito ou antígeno (Ag) e um anticorpo seletivo (Ab), formando um complexo antígeno-anticorpo (Ab-Ag). A eficiência do imunoensaio depende principalmente da

eficácia com que o complexo Ab-Ag é formado e da precisão na detecção da taxa de formação desse complexo (GUO et al., 2021).

Entre as diversas plataformas analíticas baseadas em imunoensaios, a técnica de imunoensaio de fluxo lateral (LFIA), também conhecida como teste de tira imunocromatográfica (ICST) ou teste de diagnóstico rápido (RDT), destaca-se como uma das mais bem-sucedidas para análises descentralizadas ou pontuais. Esta técnica de teste requer mínima infraestrutura de suporte. O LFIA é uma metodologia (bio) analítica baseada em papel, utilizada para a detecção *in situ* de substâncias-alvo. A amostra é aplicada em um dispositivo, e os resultados são obtidos em poucos minutos. As LFIA atendem a todos os critérios de um teste *point-of-care* (PoCT) ideal, como: acessível, sensível, específico, fácil de usar, rápido, pronto, robusto e que não necessite de equipamentos (KETTLER; WHITE; HAWKES, 2004).

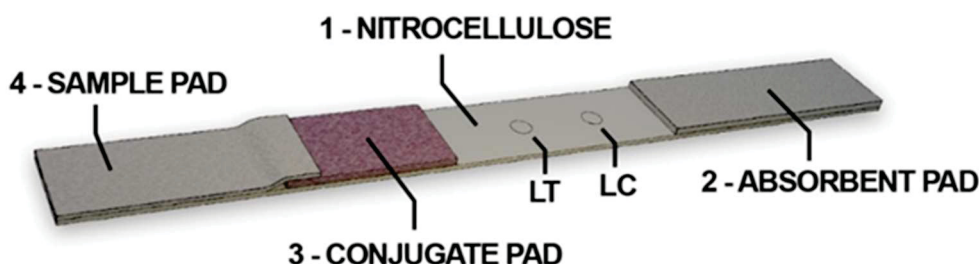
O primeiro PoCT baseado em radioimunoensaio foi implementado em 1976 para detectar gonadotrofina coriônica (hCG) na urina (GUO et al., 2021). Nos anos 1990, selênio coloidal colorido foi utilizado em um passo do imunoensaio cromatográfico para a detecção de hCG na urina em uma única etapa. Desde então, outros marcadores foram avaliados para aumentar a sensibilidade dos testes e reduzir os custos de produção (GUO et al., 2021).

Nanomateriais de 1 a 100 nm são excelentes rótulos devido às suas propriedades físicas e químicas, gerando sinais ao interagirem com analitos. LFIA com nanopartículas de ouro (AuNP) são econômicos, rápidos, simples e robustos, sendo amplamente usados em diagnósticos, monitoramento de alimentos e avaliação ambiental (GAO et al., 2024).

Uma tira de fluxo lateral padrão é composta por camadas essenciais que detectam substâncias em amostras. Inclui uma linha de teste (LT) e uma linha de controle (LC) em uma membrana de nitrocelulose (1), junto com o *conjugate pad* (3), *sample pad* (4) e *absorbent pad* (2), como ilustrado na Figura 1.

Primeiramente, a amostra líquida misturada a um tampão é aplicada no *sample pad*, que está localizado na extremidade inicial da tira. Este tampão serve para absorver a amostra e facilitar o seu fluxo capilar ao longo da tira. A amostra então passa pelo *conjugate pad*, que contém anticorpos ou antígenos marcados com partículas de ouro coloidal, látex ou nanopartículas fluorescentes. Estes conjugados reagem especificamente com a substância alvo presente na amostra, formando complexos conjugados (DI NARDO et al., 2021; GAO et al., 2022a).

FIGURA 1 - MONTAGEM DE UMA TIRA IMUNOCROMATOGRÁFICA



FONTE: A autora (2024). 1 – Nitrocelulose (LT – Linha teste e LC – Linha controle) 2 – *Absorbent pad*, 3 – *Conjugate pad* e 4 – *Sample pad*.

Em seguida, a amostra continua a fluir pela membrana de nitrocelulose, onde estão localizadas as linhas de teste (LT) e controle (LC). A linha de teste contém anticorpos ou antígenos imobilizados que capturam os complexos conjugados formados anteriormente, resultando em uma linha visível se a substância alvo estiver presente. A linha de controle, localizada mais adiante na membrana, deve sempre aparecer para confirmar que o teste funcionou corretamente, indicando que o fluxo foi adequado e que os reagentes estão ativos. Finalmente, a amostra chega à almofada absorvente, que serve para manter o fluxo constante, evitando o refluxo da amostra e garantindo que toda a tira seja utilizada de maneira eficiente. A almofada absorvente ajuda a manter a tira seca e facilita a interpretação dos resultados, que são tipicamente visíveis em poucos minutos (DI NARDO et al., 2021).

A precisão e a sensibilidade do LFIA dependem de fatores como a qualidade dos reagentes, das moléculas biológicas e as condições de armazenamento. A simplicidade de uso e a rapidez dos resultados tornam as tiras de fluxo lateral uma ferramenta valiosa para diagnósticos *point-of-care* em ambientes com recursos limitados.

Van Hooij e colaboradores (2016), desenvolveram um teste imunocromatográfico para o diagnóstico qualitativo da hanseníase utilizando quatro marcadores imunológicos combinando a detecção de imunidade celular inata e adaptativa, bem como imunidade humoral (anticorpos anti-PGL-I, IL-10, CCL4 e IP-10), em amostras de sangue total de pacientes com hanseníase (PB e MB), contatos intradomiciliares saudáveis, contatos intradomiciliares saudáveis e vacinados com a BCG, contatos intradomiciliares que desenvolveram a hanseníase após a vacinação

com a BCG e controles endêmicos, pessoas saudáveis de áreas endêmicas, mas sem contato com as pessoas doentes. Esse estudo concluiu que o PGL-1 sozinho não foi capaz de discriminar pacientes PB e contatos intradomiciliares vacinados com BCG de contatos de áreas endêmicas, sendo necessária a combinação de analito / estímulo para identificar os grupos de pacientes.

O estudo conduzido por Malcolm S. Duthie e colaboradores (2014), avaliou um novo teste sorológico, NDO-LID que demonstrou taxas de detecção mais altas para hanseníase MB e PB em comparação com o teste *Standard Diagnostics* (SD). Ambos são testes de fluxo lateral, que detectam anticorpos circulantes. O teste SD identifica anticorpos IgM contra o antígeno PGL-I de *M. leprae* utilizando NDO-BSA, que é um mimético sintético de PGL-I conjugado à albumina sérica bovina. Já o teste NDO-LID detecta tanto anticorpos IgM para PGL-I quanto anticorpos IgG específicos para a proteína LID-1, que é um produto de fusão recombinante das proteínas ML0405 e ML2331 de *M. leprae*.

O teste sorológico NDO-LID, detectou 87% dos casos de MB e 32,3% dos casos de PB, em comparação com 81,7% e 6,5% respectivamente, com o teste SD. Contudo, o teste NDO-LID apresentou uma instabilidade entre os resultados das amostras recém coletadas de amostras congeladas (DUTHIE et al., 2014).

A pesquisa desenvolvida por Van Dijk e colaboradores (2021), focou na síntese de novos conjugados de glicolipídios e na sua aplicação em testes de ELISA e de lateral flow para detectar anticorpos IgM específicos contra *Mycobacterium leprae*. Os principais resultados incluem a criação de trisacarídeos PGL-I e PGL-II, que foram usados para construir neoglicoproteínas. Essas novas neoglicoproteínas demonstraram ser eficazes na detecção de anticorpos IgM anti-PGL em pacientes com hanseníase através de ensaios quantitativos de fluxo lateral e ELISA. Apesar dos avanços na síntese de novos glicolipídios fenólicos e sua eficácia em testes ELISA e de fluxo lateral, ainda há uma necessidade de validação extensiva em cenários de campo e em populações diversas. Além disso, a complexidade do processo de síntese dos glicolipídios e a necessidade de equipamentos especializados podem limitar a aplicabilidade do método em regiões endêmicas de hanseníase, onde os recursos laboratoriais são frequentemente limitados.

Atualmente o SUS disponibilizou um teste imunocromatográfico para detecção de anticorpos IgM contra o antígeno PGL-1 do *M. leprae* em amostras de soro humano ou sangue total de contatos intradomiciliares. No entanto, a detecção de

anticorpos anti-PGL-1 não é um diagnóstico definitivo de hanseníase. Indivíduos saudáveis podem apresentar sorologia positiva, enquanto casos confirmados, especialmente os paucibacilares, podem apresentar sorologia negativa (BRASIL, 2022a; BÜHRER-SÉKULA et al., 2003).

Os testes rápidos, como os de fluxo lateral, são ferramentas valiosas para triagens devido à sua capacidade de fornecer resultados em poucos minutos sem a necessidade de uma infraestrutura laboratorial complexa. Eles são fáceis de usar, não exigindo pessoal altamente treinado, e seu formato compacto facilita o transporte e a utilização em locais com recursos limitados ou em áreas remotas. Além disso, esses testes são mais econômicos em comparação com outros métodos laboratoriais, contribuindo para a redução de custos na saúde pública. Sua versatilidade em detectar uma variedade de patógenos e condições torna-os uma opção excelente para diferentes cenários de triagem.

2.7 DISPOSITIVOS ELETROQUÍMICOS DE BAIXO CUSTO

Os sensores eletroquímicos de baixo custo são comumente produzidos utilizando técnicas de fabricação, tais como *sputtering* (deposição física de vapor), impressão a jato de tinta e serigrafia (JANECZEK et al., 2013; KANT et al., 2021; KOKKINOS; ECONOMOU; GIOKAS, 2018). Estas técnicas são aplicadas principalmente a partir de metais e materiais à base de carbono. Os substratos empregados podem ser flexíveis, como o papel, tecidos e materiais poliméricos, ou rígidos, como por exemplo o PVC, cerâmica de alumina, entre outros (BOMMINEEDI; UPADHYAY; MINNES, 2023; JANECZEK et al., 2013).

Nesse trabalho foi utilizada a técnica de serigrafia semiautomatizada, também conhecida como estêncil, ou *silk-screen*, devido ao seu baixo custo de produção e excelente rendimento.

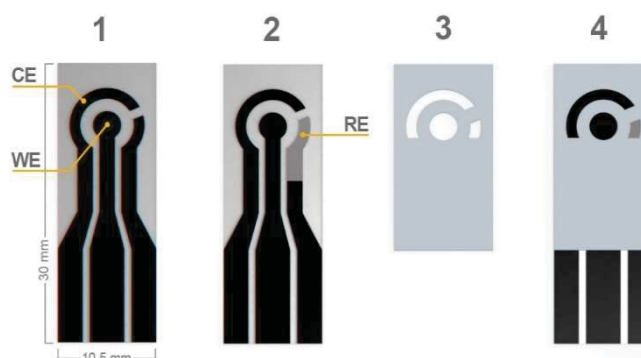
Os eletrodos foram fabricados aplicando-se uma fina camada de tinta ou pasta condutora, como pó de grafite, nanotubos de carbono, grafeno ou carbono black, sobre uma máscara negativa com o formato da célula eletroquímica. Essa máscara já está aderida a um substrato. No processo de aplicação da tinta, pode-se optar por métodos manuais, nos quais um rodo ou espátula é utilizado para espalhar e pressionar a tinta através da máscara negativa até alcançar o substrato, ou no

processo semiautomatizado, são empregados espaçadores conhecidos como *Doctor Blade*, que desempenham a mesma função (PATIL, 2023).

Depois do tempo de cura da tinta a célula eletroquímica é parcialmente coberta por uma camada de material isolante (vinil adesivo), a fim de delimitar a área dos contatos elétricos e a superfície do eletrodo. A pressão, velocidade e movimento do rodo, na aplicação manual ou do aplicador automático, têm influência direta nas propriedades do filme resultante (BOMMINEEDI; UPADHYAY; MINNES, 2023).

A Figura 2 mostra uma célula eletroquímica descartável produzida com tinta de carbono, contendo três eletrodos, sendo o eletrodo de trabalho (WE) no centro, o contra eletrodo (CE) e o eletrodo de referência (RE).

FIGURA 2 - ESQUEMA ILUSTRATIVO DA FABRICAÇÃO DE UMA CÉLULA ELETROQUÍMICA DESCARTÁVEL



FONTE: A autora (2024). 1 - Eletrodo impresso pela técnica de serigrafia semiautomatizada; 2 - Pintura do eletrodo de referência com tinta de prata/cloreto de prata; 3 - Máscara de vinil adesivo isolante e 4 - célula eletroquímica finalizada. CE – Contra eletrodo, WE – eletrodo de trabalho e RE – eletrodo de pseudo referência

No eletrodo de trabalho acontece o evento eletroquímico de interesse. Um potenciostato é usado para controlar o potencial aplicado do eletrodo de trabalho em função do potencial do eletrodo de referência. Nele é onde ocorre a reação de interesse, seja de oxidação ou redução de substâncias. O eletrodo de referência é utilizado para fornecer um potencial de referência constante e estável durante o experimento. Ele permite que o potencial do eletrodo de trabalho seja controlado de forma precisa em relação a um valor conhecido, garantindo medições precisas. O contra eletrodo, por sua vez, serve para completar o circuito elétrico na célula eletroquímica. Ele fornece uma superfície adicional para a passagem de corrente elétrica, garantindo que a reação eletroquímica ocorra de forma eficiente e sem

interferências. A corrente é registrada à medida que os elétrons fluem entre o WE e CE (ELGRISHI et al., 2018).

Para a transferência de elétrons no eletrodo, é necessário um eletrólito de suporte que migrará para equilibrar a carga e completar o circuito elétrico. Um eletrólito de suporte eficiente deve ser altamente solúvel no solvente escolhido e quimicamente inerte. O eletrólito de suporte é necessário para aumentar a condutividade da solução, facilitando a transferência de carga durante a reação no eletrodo. A condutividade da solução depende das concentrações do sal dissolvido no eletrólito, sendo crucial para o equilíbrio de carga na célula eletroquímica (ELGRISHI et al., 2018).

Para obter a resposta de uma célula eletroquímica, além da escolha dos materiais e insumos, é fundamental identificar bons biomarcadores - que podem ser explicados como indicadores de processos biológicos normais, ou de processos patogênicos, ou da resposta de uma intervenção ou exposição (GROUP, 2020). É importante ressaltar que biomarcadores diagnósticos devem ser distintos de marcadores de como uma pessoa saudável funciona e sobrevive, pois devem diagnosticar ou confirmar a doença ou a condição de interesse sem dar margem para resultados falso-negativos (CALIFF, 2018).

2.8 NANOMATERIAIS COMO MODIFICADORES

Devido às interações de van der Waals, os nanotubos de carbono (CNTs) formam agregados muito difíceis de dispersar (SAHOO et al., 2010). A modificação da estrutura dos nanotubos de carbono de parede múltipla (MWCNTs) é importante para melhorar sua dispersão em solventes e evitar a reagregação, melhorando seu desempenho. Existem duas abordagens principais para isso: modificação covalente, na qual moléculas são ligadas à estrutura dos MWCNTs, e modificação não covalente, na qual moléculas são adsorvidas na superfície dos MWCNTs (GAO et al., 2022b).

Os CNTs funcionalizados com biopolímeros têm sido considerados uma abordagem promissora para melhorar a hidrofilicidade, modificando os grupos químicos ativos dos CNTs com uma matriz polimérica (AZTATZI-PLUMA et al., 2016; DUBEY et al., 2021; WU et al., 2007). Um exemplo notável dessa estratégia é a incorporação de nanotubos de carbono em polímeros como quitosana (CS) (WANG et al., 2005).

2.9 BIOMARCADORES NA HANSENÍASE

Desde a década de 1980 e, ainda hoje, o PGL-1 tem sido amplamente explorado como biomarcador no diagnóstico da hanseníase (GURUNG et al., 2019; PENNA et al., 2016; VAN HOOIJ et al., 2016; VAN HOOIJ; GELUK, 2021). O PGL-1 é um componente exclusivo do *M. leprae*, presente principalmente na parede celular e na cápsula da bactéria. Sua estrutura molecular, caracterizada por unidades trissacarídicas únicas, o torna altamente específico, diferenciando-o de outras bactérias (GAUTAM et al., 2021; NG et al., 2000).

Inicialmente, o PGL-1 foi utilizado em um teste ELISA para detectar anticorpos IgM e IgG em pacientes diagnosticados com a doença (BRETT et al., 1983). Acreditava-se que o resultado do achado de anticorpos anti-PGL-1 nos testes indicaria a infecção e resultados negativos, a ausência. Contudo, as evidências produzidas não confirmam uma relação tão direta, havendo relatos de variações na validade do teste como preditor do desenvolvimento da hanseníase (PENNA et al., 2016).

Outros biomarcadores foram avaliados, o antígeno ESAT-6 recombinante (ML0049) foi avaliado contra soro de pacientes em teste ELISA quanto à prevalência de anticorpos IgG contra *M. leprae* rESAT-6, apresentando resultados semelhantes aos encontrados com o PGL-1 (PARKASH et al., 2007). Durante a infecção pelo *M. leprae*, o IFN- γ é liberado na resposta imunológica celular, assim, Corstjens e colaboradores (2008) produziram um ensaio de lateral flow utilizando o IFN- γ com partículas repórter de fósforo de conversão ascendente altamente sensíveis. Considerando as reações hansênicas do tipo 1 ou reversa (RR) e tipo 2 ou eritema nodoso hansênico (ENH), Stefani e colaboradores (2009), avaliaram 27 fatores plasmáticos, incluindo 16 citocinas pró-inflamatórias, 4 interleucinas anti-inflamatórias e 7 fatores de crescimento. Os biomarcadores CXCL10 e IL6 foram identificados para RR, enquanto IL7, PDGF-BB e IL6 foram indicados para marcadores laboratoriais de ENH.

Spencer e colaboradores (2011), investigaram os padrões de reatividade dos soros de pacientes em relação ao PGL-I, lipoarabinomano (LAM) e seis proteínas recombinantes do *M. leprae* (ML1877, ML0841, ML2028, ML2038, ML0380 e ML0050) por meio de *Western blot* e ELISA. Eles observaram respostas consistentes e positivas ao ML2028 (Ag85B) e ML2038 (bacterioferritina) nos grupos multibacilares e paucibacilares, enquanto as respostas aos outros antígenos mostraram uma

variabilidade significativa, indo desde fortemente positivas até completamente negativas.

As respostas sorológicas de 21 pacientes não tratados com hanseníase multibacilar e nove paucibacilares não tratados no momento do diagnóstico (linha de base) foram examinadas contra um painel de 12 proteínas recombinantes e a fração citosólica nativa de *M. leprae* (antígeno solúvel de *M. leprae* - MLSA) para avaliar padrões de reatividade sorológica em todo o espectro clínico. Os antígenos proteicos com as respostas mais robustas no grupo MB/LL foram LID-1 (100%), ML2028 (Ag85B) (100%), ML2038 (100%), ML0405 (100%), ML2055 (95%) e ML0286 (95%), destacando-se LID-1 e ML2028 (Ag85B) com as respostas mais intensas entre todas as proteínas recombinantes testadas. Em contrapartida, os padrões de reatividade sorológica para as proteínas restantes foram mais fracos e/ou mais variáveis, com ML0411 (90%), ML0091 (86%), ML0050 (CFP-10) (86%), ML0380 (10 kDa-GroES) (62%), ML0557 (29%) e ML1795 (0,5%). Nos soros PB/TT, as reatividades foram consideravelmente mais baixas do que nos soros MB/LL, mas alguns antígenos foram bem reconhecidos, incluindo ML2028 (100%), ML0286 (100%), ML2038 (100%) e LID-1 (78%) (SPENCER et al., 2012).

Com base nos estudos de Spencer e colaboradores (2012), três biomarcadores foram escolhidos para o desenvolvimento desta tese de doutorado, dois peptídeos referentes a dois epítomos imunodominantes das proteínas ML2028 (Ag85B) e ML2055 (DE SANTANA et al., 2018; SOARES et al., 2021) e um peptídeo mimético do Ag85B (ALBAN et al., 2014). O Ag85B, também conhecido como ML2028 é a proteína predominante entre o complexo antígeno 85, composto por Ag85A, Ag85B e Ag85C. Esta proteína, com cerca de 30 kDa, é reconhecida por sua capacidade de se ligar à fibronectina e elastina, além de possuir atividade altamente conservada de micoliltransferase em todas as espécies de micobactérias (CONTENT et al., 1991). A proteína ML2055 é uma proteína expressa na superfície da bactéria que se liga à laminina-2 nas células de Schwann para facilitar a invasão nervosa (SCHOREY et al., 1995).

2.10 PEPTÍDEOS SINTÉTICOS

Componentes essenciais da vida, peptídeos e proteínas desempenham papéis cruciais nos processos fisiológicos dos organismos vivos. Atuam como base

material das substâncias ativas e das atividades vitais, sendo essenciais para funções como transmissão de sinais, metabolismo energético e resposta imunológica (FORBES; KRISHNAMURTHY, 2023; XINYUE; KANG, 2023). Conhecer a estrutura e função biológica desses biopolímeros é fundamental para o desenvolvimento de medicamentos, vacinas e diagnósticos. Para isso, é necessário obter peptídeos e proteínas de alta pureza (XINYUE; KANG, 2023).

Diversas fontes naturais fornecem peptídeos e proteínas, como tecidos e órgãos de animais e plantas, além de metabólitos secundários de microrganismos. Para obtê-las, os principais métodos são a extração natural, a tecnologia recombinante e a síntese química (XINYUE; KANG, 2023).

A síntese química se destaca por sua flexibilidade e precisão na produção de peptídeos e proteínas. Essa técnica permite a introdução de aminoácidos não naturais ou modificações pós-tradução em qualquer posição das moléculas, abrangendo modificações como glicosilação, fosforilação, marcação com fluoróforos e grupos de reação de fotoreligação (AKBARIAN et al., 2022; HOU; ZHANG; LIU, 2017).

Desde a inovação de Merrifield (1963), na síntese de peptídeos em fase sólida, a síntese química tem sido um componente fundamental. As principais vantagens desta tecnologia são a livre incorporação de aminoácidos não naturais, a síntese de proteínas tóxicas para células vivas e a produção em grande escala, sem considerar a simplicidade e agilidade da técnica (AKBARIAN et al., 2022; HOU; ZHANG; LIU, 2017).

Nos últimos anos, a técnica de síntese de peptídeos em fase sólida vem crescendo em utilização. O fluorenilmetoxycarbonil desempenha um papel central como agente de proteção química, atuando como um escudo protetor para os grupos laterais dos aminoácidos, direcionando a reação química na direção desejada (LI et al., 2020).

Aliada à bioinformática - que permite a varredura de todas as sequências de proteínas previstas, a síntese química de peptídeos torna-se uma ferramenta poderosa para o desenho de peptídeos lineares e não lineares (conformacionais) de forma eficiente, rápida e econômica. Essa técnica abre caminho para a validação de novos marcadores diagnósticos (PANDEY; MALVIYA; CHOTTOVA DVORAKOVA, 2021)

Nesse trabalho, peptídeos imunorreativos de proteínas de *M. leprae* foram sintetizados quimicamente para serem empregados em imunossensores

eletroquímicos descartáveis fabricados pela técnica de impressão semiautomatizada e em testes de lateral *flow*, com o intuito de detectar anticorpos presentes no soro de pacientes com hanseníase de forma a propor um teste rápido e de baixo custo que auxilie o médico no diagnóstico da doença.

3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL – ELETROQUÍMICO

3.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

Todos os produtos químicos e solventes eram de grau analítico e usados sem purificação adicional. Polietilenoglicol sorbitano monolaurato (Tween-20, CAS 9005-64-5, ref P1379/ 1,228 g/mol); albumina sérica bovina (BSA, CAS 9048-46-8, ref A3059/ 66,00 g/mol); N-Hidroxissuccinimida (NHS, CAS 6066-32-6, ref 130672/ 115,09 g/mol); N,N-Dimetilformamida (DMF, CAS 68-12-2, ref 319937); cloreto de potássio (KCl CAS 447-40-7, ref P3911/ 74,55 g/mol); nanotubos de carbono de parede múltipla funcionalizados com ácido carboxílico (MWCNT's) – (ref 755125/ 8% carboxylic acid functionalized, diam. $\times$ L 9,5 nm $\times$ 1,5 μ m) sintetizados por deposição de vapor químico; ácido ferrocenocarboxílico (FCA, CAS 1271-42-7, ref 106887/ 230.04 g/mol); fosfato de sódio ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, CAS 10049-21-5, ref S9638/ 137,99 g/mol); soro humano masculino, filtrado, estéril, de região não endêmica (ref H3667); cloreto de sódio (NaCl, CAS 7647-14-5, ref S9888/ 58,44 g/mol); fosfato de potássio (KH_2PO_4 , CAS 7778-77-0, ref P0662/ 136,09 g/mol); hidróxido de sódio (NaOH, CAS 1310-73-2, ref S5881/ 40,00 g/mol); Poli(D-glucosamina) (CS, CAS 9012-76-4, ref 448869, DA $\geq$ 75%), hemocianina de caramujo (KLH), foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA); ácido acético glacial (CAS 64-19-7, 99,8% P.A./ 60,05 g/mol) adquirido da NEON Suzano, SP; N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida cloridrato (EDC, CAS 25952-53-8, ref. 22980/ 191,7 g/mol); sulfosuccinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (sulfo-SMCC) adquirido da Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA; Sistema Milli-Q Millipore com resistividade $\geq 18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ adquirida da Merck (Bedford, MA, EUA); peptídeos sintéticos (GTNVPAEFLENFVHG, PVSSEAQPGDPNAPS e APDDPAWQNIFNLR) produzidos pela AminoTech, São Paulo, SP, Brasil; tinta condutiva de prata 80:20 (ref C2140310D1, Gwent Electronic Materials Ltd.); pasta de carbono (ref C2130925D1, Gwent Electronic Materials Ltd.); vinil fosco, pincel fino e folhas de transparência Laser A4 (Usa Folien) foram adquiridos em comércio local.

As soluções utilizadas foram preparadas da seguinte forma: a solução salina tamponada de fosfato (0,01 M PBS pH 7,4) foi preparado com 10 mmol L^{-1} de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1,8 mmol L^{-1} de KH_2PO_4 , 2,7 mM de KCl e 137 mmol L^{-1} de NaCl, o pH

foi ajustado com NaOH e ou HCl para 7,4. Solução estoque de FCA (20 mmol L^{-1}) foi preparada solubilizando o FCA em $20 \mu\text{l}$ de NaOH ($3,0 \text{ M}$) e qsp 2 ml de KCl ($0,1 \text{ mmol L}^{-1}$). A solução foi agitada em vórtex por 5 minutos e mantida sob refrigeração e ao abrigo de luz até o momento do uso. A solução de MWNTs foi preparada a partir do protocolo de Wang e colaboradores (2005), com modificações. Resumidamente, uma solução de quitosana ($1\% \text{ m/v}$) foi preparada em ácido acético ($1\% \text{ m/v}$), pH 3 e armazenada a 4° C . Os MWCNT's foram preparados na concentração de 1 mg mL^{-1} em água MilliQ e solução de quitosana de baixo peso molecular (CS) 1% na proporção 9:1. A solução foi dispersada em ultra sonicador de ponta por 10 minutos e 20% de frequência em pulso contínuo. A solução contendo os MWCNT's ficou armazenada a 4° C até o uso.

3.2 INSTRUMENTAÇÃO E MATERIAL

O desenho do eletrodo e da máscara foi criado no software Silhouette Studio 4.2. Em seguida, utilizou-se a impressora de corte Silhouette Cameo para recortar os modelos com precisão. As medidas eletroquímicas utilizaram um potenciostato multicanal Autolab Metrohm serial nº MAC80058, em um aparato adaptado para comportar 10 portas USB. Esse aparato com as portas USB fora conectado ao potenciostato e a um computador equipado com o software Nova 2.1.6 para controle e aquisição de dados. O ultrassom de ponta (Sonics/VibraCell - VCX 750) foi utilizado para o preparo do MWCNTs. Ainda foram utilizados um espectrômetro Raman Renishaw inVia Qontor; um aplicador de filme automático Biko-drive (ref. 2121), um quadro aplicador com 4 folgas 50, 100, 150 e $200 \mu\text{m}$ Biko-drive (ref. 2057), Microscópio Eletrônico de Varredura Hitachi TM-3000 e metalizadora a vácuo - Denton Vacuum.

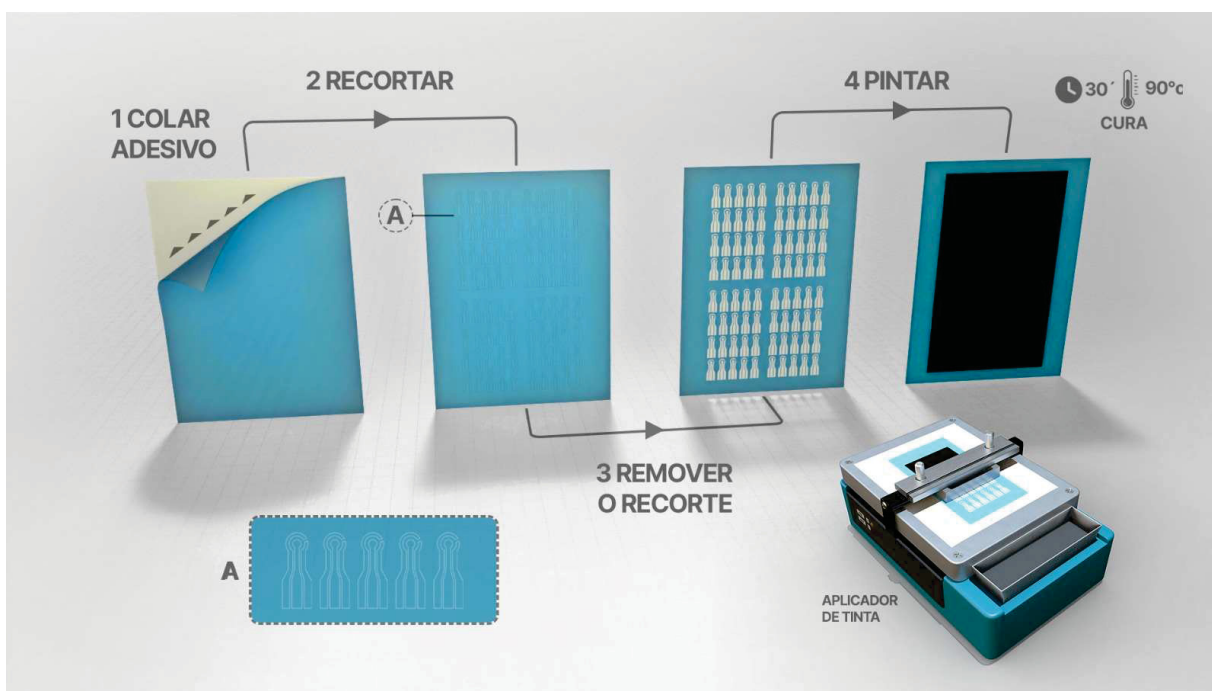
3.3 FABRICAÇÃO DO DISPOSITIVO ELETROQUÍMICO

A célula eletroquímica utilizada para o desenvolvimento do imunossensor foi um sistema padrão com três eletrodos impressos, sendo o eletrodo de trabalho (WE), um eletrodo de carbono com área de $7,07 \text{ mm}^2$, além do (RE), um eletrodo de Ag|AgCl como pseudo eletrodo de referência e um eletrodo de carbono como contra eletrodo

(CE). As dimensões da célula eletroquímica apresentam 11 mm de largura e 30 mm de altura.

O processo de fabricação seguiu o protocolo estabelecido por Afonso e colaboradores (2016), com algumas modificações para atender às necessidades específicas deste estudo. Como mostrado na Figura 3, uma folha A4 de vinil adesivo foi destacada e aplicado sobre uma folha de poliéster (Laser Folien) e com o vinil voltado para cima, o molde do eletrodo foi recortado na impressora. Após o recorte as partes indesejadas foram removidas com o auxílio pinça para formar uma máscara negativa.

FIGURA 3 - PRIMEIRA ETAPA DE FABRICAÇÃO DO DISPOSITIVO ELETROQUÍMICO



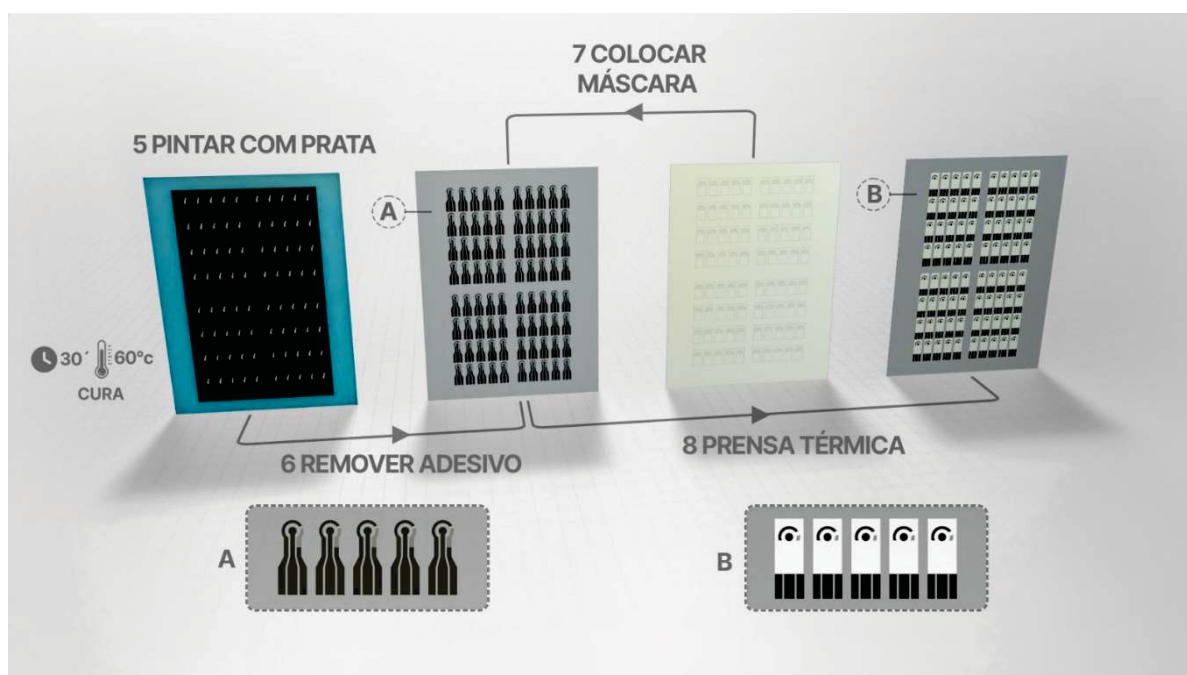
FONTE: A autora (2024). 1) preparação do modelo colando o vinil na folha transparente; 2) corte do vinil adesivo na impressora; 3) remoção do design do eletrodo, formando uma máscara negativa; 4) serigrafia com aplicador de tinta automático com tinta de carbono, seguido de cura por 30 minutos a 90° C, e um detalhe do design cortado (A).

A folha foi então posicionada sobre a mesa a vácuo do aplicador de filme e o quadro aplicador de 4 folgas semiautomático foi ajustado com a espessura de 50 μm sobre a máscara contendo o design dos eletrodos. Na parte superior do quadro aplicador foi adicionada a quantidade média de 0,05 g de tinta para cada unidade da célula eletroquímica. Com velocidade e pressão controlados pelo aplicador de filme automático, a tinta foi depositada sobre todos os eletrodos. Em seguida, os eletrodos

ficaram em estufa por 30 minutos a 90 °C, para a cura da tinta, de acordo com a indicação do fabricante.

Em seguida, mostrado na Figura 4, a tinta de prata no RE foi aplicada manualmente com pincel e os eletrodos novamente colocado em estufa por um tempo de 30 minutos a uma temperatura de cura de 60 °C. O molde de vinil foi removido, revelando o eletrodo completo.

FIGURA 4 - SEGUNDA ETAPA DE FABRICAÇÃO DO DISPOSITIVO ELETROQUÍMICO



FONTE: A autora (2024). 5) Pintura do RE com tinta de prata e cura por 30 minutos a 60 °C; 6) remoção do vinil adesivo; 7) recorte da máscara e colagem na superfície do eletrodo, isolando o WE; 8) os eletrodos foram prensados a 80 °C por 120 segundos e estavam prontos para uso. Em detalhe, o eletrodo sem máscara (A) e os eletrodos acabados (B).

Para isolar os eletrodos dos contatos elétricos e delimitar a área do eletrodo de trabalho, uma máscara de vinil foi recortada em impressora de corte e aplicada sobre a célula eletroquímica. Para finalizar, a máscara foi prensada em prensa térmica a 80 °C por 2 minutos para garantir a vedação e o isolamento do eletrodo de trabalho.

3.4 PREPARO DA SOLUÇÃO DE NANOTUBOS DE CARBONO DE PAREDES MÚLTIPLAS (MWCNT)

A dispersão de CNTs foi preparada de acordo com Wang e colaboradores (2005), com modificações. Os MWNTs foram preparados por deposição química a vapor (CVD) e funcionalizados com grupos carboxila (-COOH). Resumidamente, uma solução de quitosana (1% p/v) foi preparada em ácido acético (1% p/v), pH 3, e armazenada a 4 °C. Os MWCNTs foram preparados em uma concentração de 1 mg mL⁻¹ em água Milli-Q e em solução de quitosana a 1% em uma proporção de 9:1. A solução foi dispersa em um ultrassonicador por 10 minutos a uma frequência de 20% em pulsos contínuos e armazenada a 4 °C até o uso.

3.5 CARACTERIZAÇÃO RAMAN DO MWCNT E CS-MWCNT

Os espectros Raman foram obtidos depois da aplicação de 2 µL da solução de MWCNT e CS-MWCNT sobre uma lâmina e secagem à temperatura ambiente, em um espectrômetro Raman Renishaw inVia Qontor em geometria de retroespalhamento com a excitação do laser de 532 nm a um nível de potência de 5 mW, tempo de exposição de 10 s e objetiva de 50 x.

3.6 CARACTERIZAÇÃO POR MICROSCOPIA DE VARREDURA

O eletrodo de carbono e o eletrodo modificado CS-MWCNT foram visualizados por microscopia de varredura (HITACHI TM3000) com aumento de 1000 a 5000 vezes, com e sem metalização.

A metalização pela técnica de *sputtering* (deposição por pulverização catódica) permite a deposição de uma camada metálica de ouro uniforme e controlada em toda a superfície da amostra, garantindo que todos os aspectos da amostra sejam igualmente visualizáveis e analisáveis, especialmente para amostras que não são naturalmente condutivas ou que requerem melhor contraste e resolução na imagem final (GOLDSTEIN et al., 1992).

Foi utilizada uma metalizadora a vácuo (Denton Vacuum) por 1 minuto com corrente de 35 mA para garantir a deposição sobre toda a superfície do eletrodo.

3.7 CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DO BIOSSENSOR

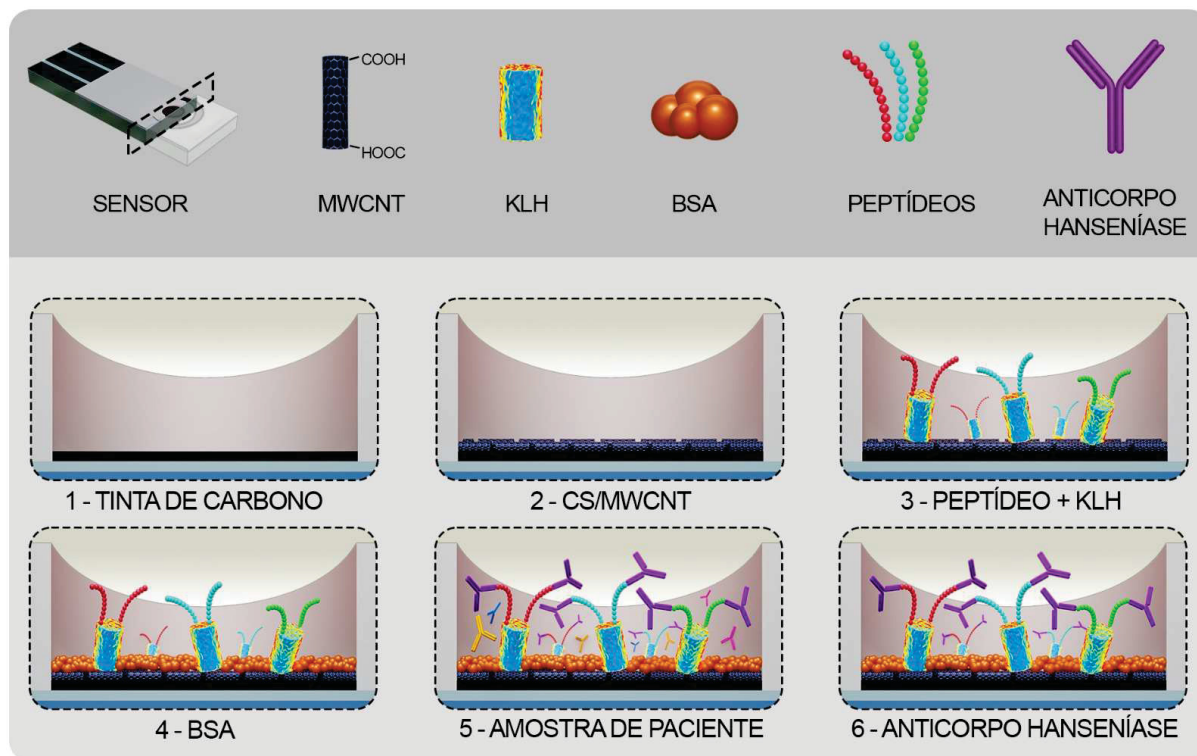
A etapa preliminar do estudo avaliou cada etapa da modificação do eletrodo de trabalho. Todos os experimentos foram realizados usando um sistema de três eletrodos, com um eletrodo de carbono como WE e CE e um eletrodo de RE de prata (Ag/AgCl), interfaceado com um potenciostato/galvanostato. Para a etapa da caracterização uma amostra simulada foi preparada com PBS pH 7,4, acrescido de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de FCA. Foram aplicados $10 \text{ }\mu\text{L}$ da amostra simulada sobre WE e $40 \text{ }\mu\text{L}$ de PBS como eletrólito de suporte sobre os três eletrodos. O potencial de voltametria cíclica (CV) foi varrido de $-0,05$ a $0,45 \text{ V}$ a uma velocidade de varredura de $0,05 \text{ V s}^{-1}$. A técnica eletroquímica utilizada para detecção foi a voltametria de pulso diferencial (DPV) considerando um potencial inicial de $-0,05$ e final de $0,45 \text{ V}$ a uma velocidade de varredura de $0,01 \text{ V s}^{-1}$.

3.8 MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE ELETRÓDICA DA CÉLULA ELETROQUÍMICA DESCARTÁVEL COM NANOESTRUTURA DE CARBONO E PEPTÍDEOS SELETIVOS

A Figura 5 mostra as etapas de modificação do eletrodo de trabalho. O WE foi modificado com $5 \text{ }\mu\text{L}$ da solução de CS-MWCNT e, após a aplicação, os eletrodos foram secos em estufa a 60° C por 20 minutos. Para ativar os grupos carboxílicos do CS-MWCNT, $10 \text{ }\mu\text{L}$ da solução de EDC/NHS ($0,4 \text{ mol L}^{-1}$ e $0,2 \text{ mol L}^{-1}$) preparada em PBS pH 7,4 foi adicionada sobre os WE por 15 minutos. O EDC é usado para ligar aminas primárias a ácidos carboxílicos e quando usado em conjunto com NHS, proporciona maior estabilidade e eficiência (CRAPNELL et al., 2022; WELCH et al., 2017; YEN et al., 2009).

Posteriormente, o excesso foi removido com papel absorvente e $10 \text{ }\mu\text{L}$ ($21 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$) do pool de peptídeos APDD, PVSS e GTNV carregados em KLH foram aplicados em PBS pH 7,4 e incubados em câmara úmida por 3 horas. Após esse período o WE foi lavado 2 vezes com $10 \text{ }\mu\text{L}$ de PBS pH 7,4 e o excesso de peptídeo carregado, retirado com papel toalha. Para reduzir as interações não específicas, os sítios não ligados foram bloqueados com BSA (1% m/v) em uma câmara úmida a temperatura ambiente por 1 hora. O excesso de BSA foi lavado duas vezes com $10 \text{ }\mu\text{L}$ de PBS pH 7,4 e retirado com papel absorvente.

FIGURA 5 - ETAPAS DE MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE DO ELETRODO DE TRABALHO



FONTE: A autora (2024). 1) Eletrodo de carbono; 2) camada contendo os CS-MWCNT; 3) conjugação com os peptídeos carregados na proteína carreadora KLH; 4) incubação com BSA; 5) incubação com soro de paciente e 6) imunossensor finalizado.

As amostras de soro humano, negativas e positivas (PB e MB) foram preparadas previamente na diluição 1:100 em PBS pH 7,4 e incubadas por 60 minutos com volume de 10 μ L sobre o WE. Após o período de incubação o excesso foi retirado com papel absorvente e lavado 2 vezes com 10 μ L de PBS pH 7,4. A leitura eletroquímica foi realizada após as modificações realizadas.

3.9 AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Após a obtenção da aprovação pelo Comitê de Ética, sob o número 58749316.0.0000.0102, e a devida assinatura do termo de consentimento pelos participantes, foram utilizadas 85 amostras de indivíduos diagnosticados com hanseníase na região de Guarantã do Norte, localizada no estado de Mato Grosso do Sul e de pacientes de região não endêmica, provenientes de doadores de sangue. Essas amostras foram submetidas a uma análise sorológica no Laboratório de

Sorologia do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná (Hemepar) e posteriormente armazenadas em temperatura de -20°C .

As amostras de sangue total foram coletadas em tubos contendo gel separador e posteriormente submetidas a uma centrifugação a 2500 rpm, durante 10 minutos. O soro resultante foi separado e armazenado em temperatura de -20°C para utilização posterior.

3.10 AVALIAÇÃO DE PEPTÍDEOS SINTÉTICOS BASEADOS EM EPÍTOPOS LINEARES E CONFORMACIONAIS

As sequências peptídicas utilizadas nesse trabalho caracterizam-se pelas sequências GTNVPAEFLENFVHG e PVSSEAQPGDPNAPS, a primeira um epítipo linear proveniente do Ag85B (ML2028, número de acesso GenBank: CAA43269.1) e a segunda faz parte da proteína ML2055 (número de acesso GenBank: P46842), ambas foram denominadas GTNV e PVSS (SOARES et al., 2021), respectivamente. Um terceiro peptídeo corresponde a um epítipo mimético e conformacional, chamado APDD, com sequência APDDPAWQNIFNLR (patente BR1020150047800) (ALBAN et al., 2013, 2014). Para aumentar a flexibilidade, um espaçador glicina/serina (GSGS) foi adicionado às sequências, seguido por uma cisteína terminal para facilitar o acoplamento à proteína carreadora (SHANG et al., 2011).

3.11 CONJUGAÇÃO DOS PEPTÍDEOS NA PROTEÍNA CARREADORA KLH

Três peptídeos designados como APDD, PVSS e GTNV foram conjugados à hemocianina de caramujo (KLH) usando sulfo-SMCC como agente de reticulação. Resumidamente, 5 mg de KLH foram dispersos em 1 mL de PBS 20 mmol L^{-1} (pH 7,4) contendo 0,15 mol de NaCl e ativados com uma solução de 4,8 mg mL^{-1} de sulfo-SMCC. Após 30 minutos de agitação à temperatura ambiente, o KLH-sulfo-SMCC foi recuperado por meio de uma coluna PD-10 descartável e incubado com cada um dos peptídeos contendo cisteína (5 mg mL^{-1}) à temperatura ambiente por 30 minutos, sob agitação lenta e proteção contra a luz. Para bloquear os grupos tiol livres, foi adicionada cisteína a 1,0 mmol L^{-1} e incubada por 20 minutos sob agitação. Após a diálise, os peptídeos-KLH foram divididos em alíquotas e armazenado a -20°C (SOARES et al., 2021).

3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi utilizado o programa *Statistica 7.0* para a análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey com 95% de confiança. Os gráficos foram plotados no programa *Origin Pro 9.0* e *GraphPad Prism 8*, a curva ROC foi calculada utilizando o software MedCalc.

4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL – LATERAL FLOW IMMUNOASSAY (LFIA)

4.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

Cloreto de ouro tri hidratado ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), citrato de sódio diidratado ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$); albumina sérica bovina (BSA, CAS 9048-46-8, ref A3059 / 66.00 g/mol); anticorpo IgG anti-humano produzido em cabra (cód. I2136, Lote: 0000102178), anticorpo IgG anti-humano produzido em coelho (cód SAB3701275, lote RI43508) foram obtidos pela Sigma-Aldrich; tampão salina fosfato (PBS 10X, pH 7,4 lote 180.623JN) adquirido da Nova Biotecnologia; IgG mouse (cód. ab198772, 5 mg, Lote: GR3345184-4); IgG anti-mouse (cód ab6709, Lote: GR3293750-6) adquiridos da Abcan, Cambridge, Biomedical Campus; *sample pad* C1 e *absorbent pad* C5 (celulose); *conjugate pad* Fusion 5 (fibra de vidro), e nitrocelulose AE99 foram obtidos da GE Healthcare®; *backing card* adesivos Millipore® *Laminated Cards* (HF000MC100) foram adquiridos da Merck.

4.2 INSTRUMENTAÇÃO E MATERIAL

Foi utilizada uma balança analítica Mettler Toledo, modelo XP205; agitador magnético microprocessado com aquecedor Quimis, modelo Q261M23 e barra magnética de (4 cm) para a síntese química da nanopartícula de ouro; o nanoespectrofotômetro UV-Vis (Nanodrop One – Thermo Scientific) foi utilizado para a verificação das bandas da AuNP e dosagem das proteínas; a estufa de secagem e esterilização Tecnal, Modedo TE 393, capacidade de 80 L foi utilizada para a secagem das tiras e microscópio estéreo modular com zoom motorizado (SteREO Discovery.V20 – ZEISS) para fotografar as tiras imunocromatográficas.

4.3 SÍNTESE QUÍMICA DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO

A síntese química de nanopartículas de ouro (AuNPs) envolve a redução de íons de ouro em solução aquosa, utilizando agentes redutores como borohidreto de sódio ou citrato de sódio (GRYS et al., 2020).

Toda a vidraria utilizada, incluindo o frasco de envase e os demais materiais do preparo, foram inicialmente lavados com detergente neutro e enxaguados com

água corrente. Em seguida, foram enxaguados com água ultrapura e imersos em uma solução de ácido nítrico e ácido clorídrico concentrados, na proporção de 1:3 ($\text{1HNO}_3\text{:3HCl}$), sob capela de exaustão, por 15 minutos. Após esse processo, foram novamente enxaguados com água ultrapura e colocados em uma estufa a 60 °C até estarem completamente secos.

O cloreto de ouro trihidratado ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) e o citrato de sódio diidratado ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) foram adquiridos da Sigma-Aldrich. A solução contendo as nanopartículas de ouro foi preparada utilizando um agitador com uma barra magnética de aproximadamente 4 cm.

O método de preparação seguiu a metodologia de Turkevich, Stevenson e Hillier (1941) com algumas adaptações. Foram preparadas duas soluções estoque para a síntese das nanopartículas de ouro: uma solução aquosa de cloreto de ouro trihidratado ($1,4 \text{ mmol L}^{-1}$) em 100 mL de água ultrapura e uma solução de citrato de sódio diidratado (1% m/v) em 10 mL de água ultrapura, ambas à temperatura ambiente. Os béqueres contendo essas soluções foram cobertos com papel alumínio e armazenados em geladeira até o momento da síntese.

O aquecedor do agitador magnético foi ligado e a solução de cloreto de ouro foi agitada a 850 RPM. Quando a solução atingiu 85 °C, a solução de citrato de sódio foi adicionada rapidamente, resultando em uma mudança de cor, de amarelo para preto e, finalmente, para bordô, em menos de um minuto. A agitação foi mantida por mais 4 minutos, com a temperatura entre 85 e 87 °C. Após esse período, a solução foi resfriada em banho de gelo até alcançar a temperatura ambiente (26 °C).

O pH da solução foi ajustado para 7,4 com uma solução de borato de sódio 1 mol L^{-1} . Ao ajustar o valor de pH próximo ao ponto isoelétrico da molécula de ligação pode orientar a ligação direta às nanopartículas estabilizadas com citrato, aumentando a eficiência do processo (RUIZ et al., 2019).

Por fim, a solução foi transferida para um frasco com tampa, protegido da luz, e armazenado em geladeira até ser utilizado.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DA AUNP POR ESPECTROFOTÔMETRO

Para confirmar a formação da nanopartícula de ouro, uma alíquota de 2 μL da solução de NP de ouro em temperatura ambiente, recém-sintetizada, foi analisada em espectrofotômetro UV-Vis (Nanodrop One – Thermo Scientific) em comprimento de

onda de 520, 525 e 530 nm. Para o branco, foi preparada uma solução estoque de 10 mL de citrato de sódio (1%), o volume utilizado foi de 2 μ L, no mesmo comprimento de onda.

O procedimento acima foi realizado 3 vezes, tomadas as medidas e calculada a média da absorbância.

4.5 CARACTERIZAÇÃO DA AUNP POR ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO (DLS)

O tamanho e a distribuição de tamanho (por intensidade e número) foram obtidos através de análise no equipamento DLS Microtrac Nanotrac Ultra, com range de 0,8 a 6500 nm utilizando o *laser* em comprimento de onda de 780 nm, ângulo de espalhamento de 180°, temperatura de 25 °C, em meio aquoso e em cubeta de quartzo. Dois mililitros da solução coloidal de AuNPs foram utilizadas para determinar a intensidade e a distribuição do tamanho do número de partículas. Os valores do diâmetro foram obtidos pela média de 8 medidas de 30 segundos.

4.6 CONJUGAÇÃO DO POOL DE PEPTÍDOS CARREADOS ÀS NANOPARTÍCULADAS DE OURO

As nanopartículas de ouro (AuNP) foram inicialmente diluídas para uma densidade óptica (D.O.) de 1,5 a 525 nm, misturando-se 300 μ L da solução de AuNP com 700 μ L de água ultrapura. Em seguida, foram preparadas duas soluções: uma com o pool de peptídeos carregados em KLH na concentração de 2 μ g mL⁻¹ e outro, com o IgG de camundongo, na concentração de 9 μ g mL⁻¹. Em cada tubo foi adicionada a solução diluída de AuNP. As misturas foram submetidas a agitação lenta por 30 minutos. Posteriormente, 100 μ L de uma solução de bloqueio composta por 1% de BSA e 0,5% de Tween 20 foram adicionados a cada tubo, seguidos de mais 30 minutos de agitação leve.

Os tubos foram então centrifugados a 14.000 RPM e -4° C por 30 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e 300 μ L de tampão de ressuspensão, contendo: 1% de BSA, 5% de sacarose, 0,5% de Tween 20 e PBS 10 mmol L⁻¹, foram adicionados a cada tubo. As soluções contendo o pool de peptídeos carregados e IgG de camundongo foram então combinadas e depositadas no *conjugate pad*. O

conjugate pad foi mantido em uma sala com umidade variando de 30 a 40% e temperatura entre 20 e 23 °C por 24 horas, para subsequente utilização.

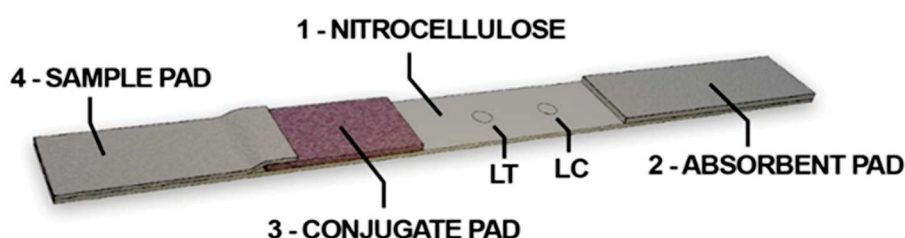
4.7 MONTAGEM DAS TIRAS DE IMUNOCROMATOGRAFIA

Para a montagem das tiras, o *conjugate pad* já deve estar depositado e seco há 24 horas em baixa umidade ou, pelo menos, 3 horas em estufa à 35 °C. Para a montagem das tiras de LFIA, inicialmente, foi removido o adesivo da parte central do *backing card* para posicionar a membrana de nitrocelulose com uma largura de 25 mm. Em seguida, o *absorbent pad*, com 15 mm de largura, foi colocado em uma das extremidades da membrana, sobrepondo-se à ela em 1 a 2 mm. O *conjugate pad*, com 7 mm de largura e impregnado com o bioconjugado de interesse, foi adicionado adjacente à membrana de nitrocelulose, também sobrepondo-se a esta em 1 a 2 mm. Finalmente, o *sample pad*, com 15 mm de largura, foi colado na extremidade oposta ao *absorbent pad*, sobrepondo-se ao *conjugate pad* em 1 a 2 mm.

Após a montagem, as tiras foram cortadas com uma largura de 5 mm e armazenadas em dessecador com sílica até o momento do uso.

Para permitir a captura da partícula de ouro decorada com o pool de peptídeos carregados, à linha teste (LT) foi adsorvido anticorpo anti IgG humana, enquanto, para a retenção da nanopartícula conjugada à IgG de camundongo, na linha controle (LC) foi adsorvido o anticorpo anti IgG murina, conforme ilustrado na figura abaixo (Figura 6).

FIGURA 6 - MONTAGEM DE UMA TIRA IMUNOCROMATOGRAFICA



FONTE: A autora (2024). 1 – Membrana de nitrocelulose adsorvido na LT IgG anti-humano e na LC IgG anti-mouse; 2 – *Absorbent pad*; 3 – *Conjugate pad* depositado com AuNP/Ab murino e AuNP/Pep. + KLH e 4 – *Sample pad*

4.8 AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Para o teste de LFIA foram utilizadas as mesmas 46 amostras da soroteca (CN, PB e MB) utilizadas para o biossensor eletroquímico, com exceção de duas amostras de pacientes MB que não apresentaram volume suficiente para o experimento e foram substituídas por duas outras amostras de pacientes MB, selecionadas ao acaso.

4.9 LEITURA DAS TIRAS

As amostras foram processadas individualmente com o tampão de corrida. Primeiro, 10 μ L de soro, tanto das amostras positivas (PB e MB) quanto das negativas para a doença, foram misturadas com 100 μ L do tampão de corrida. Na etapa de leitura, 40 μ L dessa mistura foram aplicados inicialmente, e após 5 minutos, foram adicionados mais 60 μ L para cada tira/amostra. Os resultados puderam ser verificados entre 15 e 30 minutos após a aplicação.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As tiras foram fotografadas com iluminação controlada em microscópio estéreo modular com zoom motorizado (SteREO Discovery.V20 – ZEISS) e quantificadas no software de imagem IMAGEJ (<https://imagej.net/ij/>). Essa abordagem permite que as informações de cor de uma imagem sejam transformadas em dados quantitativos precisos, que podem ser usados para diversas aplicações científicas, como a quantificação de proteínas ou outros biomarcadores em estudos de biologia molecular.

Os gráficos foram plotados no programa *Origin Pro 9.0* e *GraphPad Prism 8*, a curva ROC foi calculada utilizando o software MedCalc.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO – ELETROQUÍMICO

Neste trabalho de doutorado, em sua primeira etapa, foi desenvolvido um sensor para detecção de anticorpos usando um eletrodo de carbono modificado com uma camada de CS-MWCNTs. Para isso, grupos carboxílicos COOH dos MWCNTs foram ativados com EDC/NHS para que se ligassem à proteína KLH, a qual foi previamente conjugada a peptídeos imunorreativos de proteínas de *M. leprae*. A sonda redox FCA e as técnicas voltametria cíclica (CV) e voltametria de pulso diferencial (DPV) foram utilizadas para analisar a interação e quantificação de anticorpos em amostras de soro de pacientes. Nas próximas seções, está detalhado o estudo das características dessas etapas após a montagem no eletrodo.

5.1 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DO ELETRODO DE TRABALHO MODIFICADO

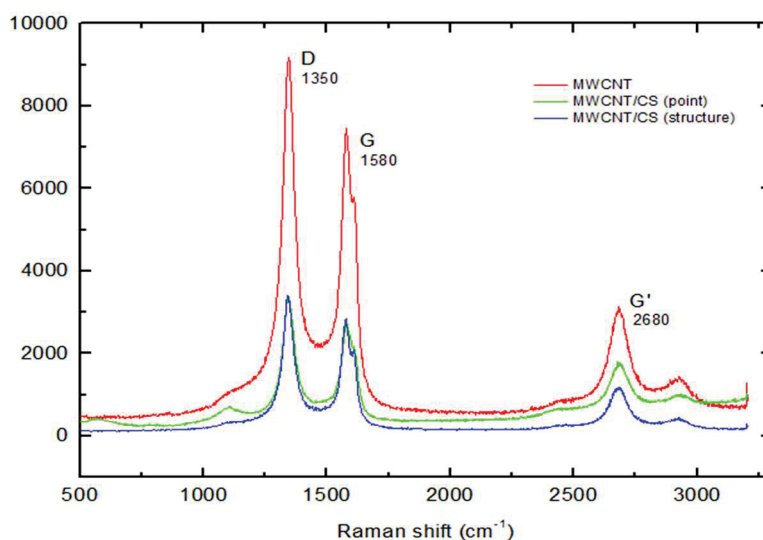
5.1.1 Espectroscopia Raman

Os espectros Raman de MWCNTs-COOH apresentaram picos característicos nas bandas D ($\sim 1350\text{ cm}^{-1}$), G ($\sim 1580\text{ cm}^{-1}$) e G' ($\sim 2670\text{ cm}^{-1}$) (Figura 7). A banda D é associada à desordem estrutural dos nanotubos, originada por defeitos estruturais, materiais desordenados, grafitação incompleta, carbono funcionalizado e carbono amorfo localizados nas paredes laterais dos MWCNTs. Por outro lado, a banda G reflete a vibração de átomos de carbono hibridizados sp^2 , representando a estrutura ordenada de grafite dos nanotubos. A banda G', resultante de uma propagação de segunda ordem, é sensível à quantidade de defeitos estruturais nos MWCNTs (CHEN et al., 2013; DILEO; LANDI; RAFFAELLE, 2007; SHANG et al., 2011).

A razão entre as intensidades da banda D e banda G (ID/IG) é usada para avaliar a qualidade dos CNTs, uma vez que os valores da relação mais baixos indicam uma melhoria na estrutura ordenada e, portanto, os CNTs de melhor qualidade (SHANG et al., 2011; TSENG; TSENG; KUO, 2009). A razão dos valores de ID/IG foram 1,23 para MWCNTs e 1,20 para CS/MWCNT. O valor da razão ID/IG dos MWCNTs diminuiu após a modificação da superfície das moléculas de CS, indicando que essa alteração ajudou a reduzir a desordem estrutural e a quantidade de defeitos

nos MWCNTs, compatíveis com o espectro Raman (Figura 7) (DUBEY et al., 2021; SHANG et al., 2011; TSENG; TSENG; KUO, 2009). Ao contrário de Liu e colaboradores (2024), mesmo após a dispersão dos nanotubos com a quitosana, não foram observadas alterações significativas na proporção ID/IG, indicando que a modificação não covalente não alterou a estrutura ou a morfologia dos nanotubos.

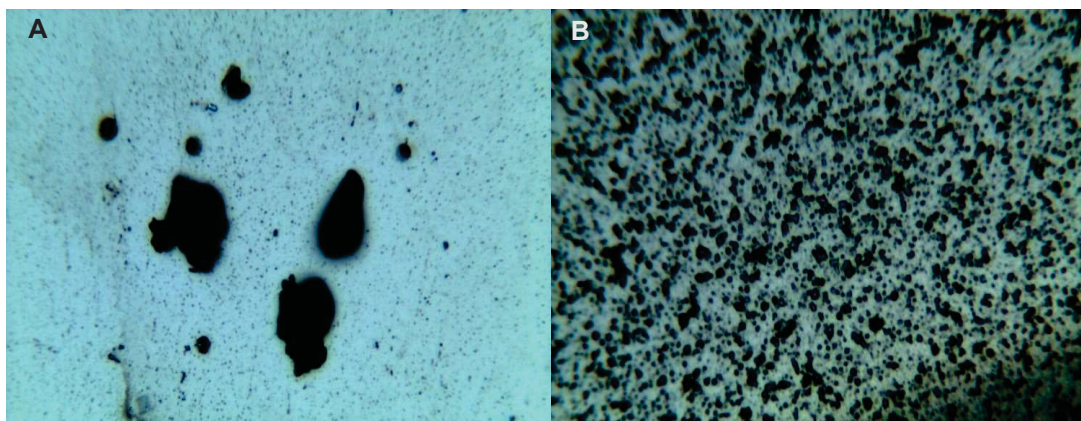
FIGURA 7 - ESPECTRO RAMAN DOS MWCNT



FONTE: A autora (2024). MWNTs e CS-MWCNRs (ponto e estrutura). A energia do laser incidente foi de 5 mV por 10 s. As tendências das bandas D, G e G' podem ser vistas nos pontos mais altos.

Como pode ser visto na Figura 8 (A) os MWCNTs formam agregados estáveis devido a interações emergentes do tipo van der Waals (SAHOO et al., 2010).

FIGURA 8 - IMAGENS RAMAN DOS MWCNT



FONTE: A autora (2024). Imagens obtidas com aumento de 50 X. Ambas as amostras foram solubilizadas em ultrassonicador por 10 minutos. A) MWCNTs dispersos em água ultrapura e em B) CS/MWCNT

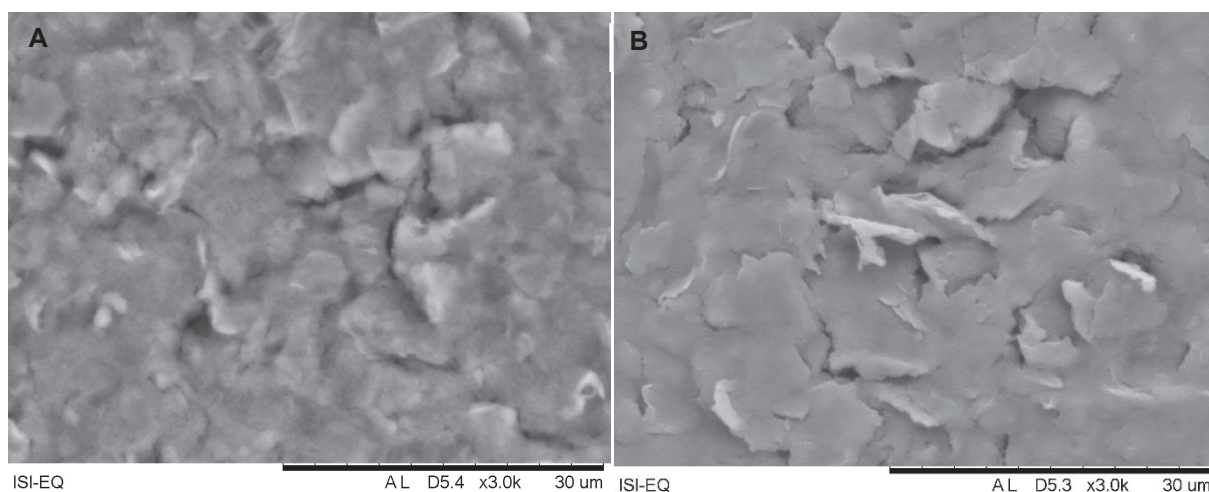
As subunidades de glucosamina da quitosana contêm três tipos de grupos funcionais: amino, hidroxila primária e hidroxila secundária. Por sua vez, os MWCNTs funcionalizados possuem grupos carboxílicos e hidroxila, possibilitando a formação de fortes ligações de hidrogênio com a quitosana. Na Fig. 8 B) é possível observar o resultado dessa compatibilidade e da interação entre as cargas dos MWCNTs com a matriz e a consequente melhora na dispersão, bem como uma maior adesão interfacial e aumento das propriedades mecânicas da matriz (GAO et al., 2022b).

5.1.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O eletrodo de carbono e o eletrodo modificado com CS-MWCNTs foram observados no microscópio de varredura HITACHI - TM3000 com aumento de 1000 a 5000 vezes com e sem metalização com ouro pela técnica de *sputtering*, como o objetivo de avaliar a morfologia da superfície do eletrodo.

Na Figura 9, a ampliação de 3000 vezes do eletrodo de carbono é apresentada em duas condições distintas: sem metalização (Figura 9A) e com metalização em ouro realizada pela técnica de *sputtering* (Figura 9B). Observou-se a presença de folhas de grafite com uma morfologia rugosa, característica típica de eletrodos fabricados com tinta de carbono (DE OLIVEIRA et al., 2021).

FIGURA 9 - IMAGEM MEV DO ELETRODO DE CARBONO SEM METALIZAÇÃO E COM METALIZAÇÃO PELO TÉCNICA DE SPUTTERING

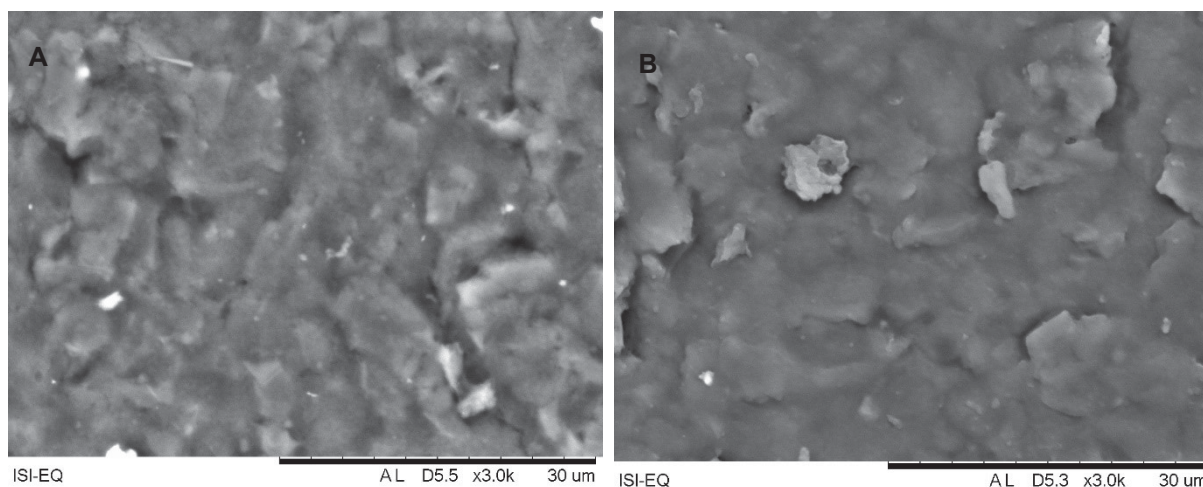


FONTE: A autora (2024). Imagem MEV com aumento de 3000 X. A) Sem ouro, B) Com ouro. Em ambas, é possível notar os folhetos típicos de camadas de carbono.

Essa rugosidade superficial está diretamente relacionada à taxa de transferência de elétrons, indicando que eletrodos serigrafados com superfícies mais ásperas favorecem uma reversibilidade eletroquímica aprimorada. Esse efeito é atribuído ao aumento do número de defeitos ou planos de borda expostos na superfície do sensor, que atuam como sítios ativos para reações eletroquímicas (KADARA; JENKINSON; BANKS, 2009).

Na Figura 10 são mostradas as imagens do eletrodo de trabalho depois da aplicação com 1 mg mL⁻¹ CS-MWCNTs em aumento de 3000 vezes. Em A) sem a metalização e em B) com a metalização. Foi possível observar pequenos fragmentos brilhantes que podem ser resíduos da tinta de prata, que depositaram no CS-MWCNTs durante o processo de fabricação dos eletrodos.

FIGURA 10 - IMAGEM MEV DO ELETRODO APÓS A DEPOSIÇÃO DO CS-MWCNT SEM METALIZAÇÃO E COM METALIZAÇÃO PELO TÉCNICA DE *SPUTTERING*



FONTE: A autora (2024). A autora (2024). Imagem MEV de eletrodos modificados com CS-MWCNT, com aumento de 3000 X. A) Sem metalização e B) Com metalização

Não foi possível visualizar os nanotubos de carbono nas análises realizadas devido às limitações de ampliação e resolução do equipamento e à técnica empregada. Os nanotubos possuem diâmetros da ordem de 9,5 nm e comprimento aproximado de 1,5 μm. Considerando a resolução prática de um microscópio eletrônico de varredura (MEV), que geralmente é mais adequada para estruturas acima de 10 nm em diâmetro, a observação de nanotubos com essas dimensões pode ser desafiadora, especialmente em materiais com estruturas agregadas ou em amostras que apresentam sobreposição de camadas.

Nas imagens obtidas, foi identificada apenas uma morfologia irregular, sem a definição clara dos nanotubos. Isso sugere que a técnica de preparação da amostra, bem como o ajuste de parâmetros do MEV, como tensão de aceleração e contraste, pode não ter sido ideais para realçar as características finas dos nanotubos. A recomendação é utilizar técnicas complementares, como microscopia eletrônica de transmissão (TEM), que oferece resolução mais adequada para estruturas nanométricas, ou ajustes adicionais no preparo da amostra para melhor dispersão e contraste, a fim de facilitar a visualização dos nanotubos.

5.2 AVALIAÇÃO DE CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS E CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA ETAPA POR ETAPA DAS MODIFICAÇÕES DO ELETRODO DE TRABALHO

A etapa preliminar do estudo eletroquímico avaliou cada etapa da imobilização sobre o eletrodo de trabalho. Todos os experimentos foram realizados usando um sistema de três eletrodos com um eletrodo de carbono como eletrodo de trabalho (WE) e contra eletrodo (CE) e um eletrodo de pseudoreferência (RE) com prata (Ag/AgCl), incorporado em um potenciostato/galvanostato. O tampão PBS pH 7,4 foi usado como eletrólito de suporte, utilizando a técnica de voltametria cíclica (CV), o potencial foi varrido de -0,3 a 0,45 V vs. Ag|AgCl a uma velocidade de varredura de 0,05 V s⁻¹.

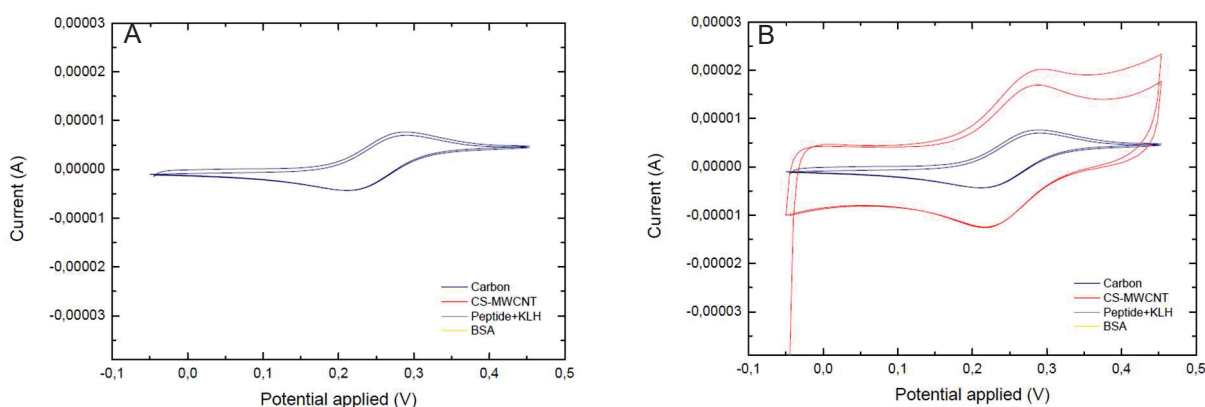
Uma amostra simulada foi preparada, adicionando-se 1,0 mmol L⁻¹ de ácido ferrocenocarboxílico (FCA) ao PBS, imediatamente antes da medida eletroquímica. O ferroceno [Fe(C₅H₅)₂] é uma molécula neutra que contém um átomo de ferro em estado de oxidação +2, entre dois anéis de ciclopentadieno (Cp) (SHAO et al., 2010). O FCA contém um grupo carboxílico (COOH) em um desses anéis de ciclopentadieno [Fe(Cp)(COOH)]⁺. Essa característica permite que o FCA passe por reações de oxidação e redução, resultando em alterações em seu estado de oxidação e, consequentemente, no número de elétrons. Essa propriedade redox é intrínseca a esse composto e desempenha um papel fundamental em suas aplicações em eletroquímica (OTERO et al., 2008).

Os MWCNTs são estruturas cilíndricas compostas por várias camadas de folhas de grafeno, compostas por átomos de carbono. Essas folhas de grafeno possuem elétrons π (π), localizados ao longo de sua estrutura, tornando-os excelentes

condutores elétricos (WIPAWAKARN; JU; WONG, 2012). O MWCNT foi utilizado para imobilizar a proteína carreadora conjugada aos peptídeos imunorreativos de *M. leprae* e, ao mesmo tempo, permitir a transferência de elétrons.

Na reação redox, o nanotubo de carbono age como um transdutor de elétrons. Esses elétrons são conduzidos ao longo da estrutura do nanotubo de carbono e são detectados gerando uma resposta eletroquímica proporcional à quantidade de ferroceno presente e, por consequência, é possível detectar indiretamente a presença de anticorpos específicos aos peptídeos de *M. leprae* e quantificá-los (YANG et al., 2018). A corrente resultante é medida e registrada em função do potencial aplicado. Essa curva de corrente-potencial é conhecida como voltamograma e fornece informações sobre os processos redox que estão ocorrendo no eletrodo (YANG et al., 2018).

GRÁFICO 1 - ESTUDO DE VOLTAMETRIA CÍCLICA ETAPA POR ETAPA – CARBONO E CS-MWCNT



FONTE: A autora (2024). A) Voltametria cíclica mostrando os picos de oxidação/redução do eletrodo de carbono e B) eletrodo de carbono e CS-MWCNT.

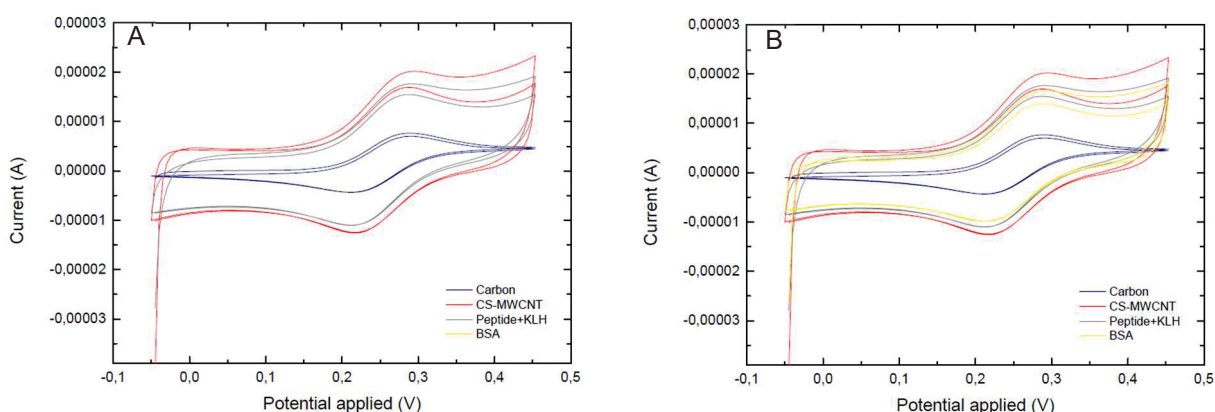
A primeira varredura (Gráfico 1 A) foi realizada com o eletrodo impresso de carbono sem modificação (azul escuro). Nessa etapa, foi aplicado um volume de 50 μL da amostra simulada sobre o WE, RE e CE. O potencial foi varrido de -0,05 a 0,45 V vs. Ag|AgCl a uma velocidade de varredura de $0,05 \text{ V s}^{-1}$, utilizando um potenciostato Autolab Metrohm com suporte do software Nova 2.1.6.

O gráfico 1 A, representado pela linha azul escuro, podemos observar um pico de oxidação em aproximadamente 0,28 V vs. Ag|AgCl e um pico de redução em aproximadamente 0,23 V vs. Ag|AgCl.

Com adição da camada CS-MWCNT's (linha vermelha), pode-se observar um par de picos na mesma faixa de potencial, porém, com um aumento de 163% na corrente. A adição de uma camada de CS/MWCNT proporcionou um aumento na resposta de corrente, indicando que ocorreu a modificação na superfície do eletrodo quando comparado com o eletrodo de carbono impresso em tela (Screen-Printed Carbon Electrode – SPCE) sem modificação (Gráfico 1A).

O aumento de corrente observado com a adição da camada de CS-MWCNTs ao eletrodo de carbono impresso em tela (SPCE) está diretamente relacionado ao aumento da área superficial efetiva do eletrodo, proporcionado pelo material nanoestruturado. Os nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNTs) apresentam uma elevada razão entre área superficial e volume, o que permite maior exposição de sítios ativos na interface eletrodo/solução (ELGRISHI et al., 2018).

GRÁFICO 2 - VOLTAMETRIA CICLICA ETAPA POR ETAPA – PEPTÍDEOS CARREADOS E BSA



FONTE: A autora (2024). A) Voltametria cíclica mostrando os picos de oxidação/redução do eletrodo de carbono, CS-MWCNT e peptídeos carregados em KLH e B) Picos de oxidação/redução do eletrodo de carbono, CS-MWCNT, peptídeos carregados em KLH e BSA.

Após ativar os grupos carboxílicos com agentes de reticulação EDC/NHS (0,4 / 0,2 mol L⁻¹) e estabelecer interações com o conjunto de peptídeos carregados (APDD, PVSS e GTNV), na concentração de 21 µg mL⁻¹, foi observada a preservação dos picos redox, ou seja, ausência de alteração no potencial de oxidação e redução do FCA, e uma redução do valor da corrente de 14% em comparação ao eletrodo recoberto com CS-MWCNT, indicando que os peptídeos com baixa condutividade foram eficientemente capturados na superfície do eletrodo. Esse processo de captura

dos peptídeos dificultou a transferência de elétrons da sonda redox, indicando o sucesso da interação (Gráfico 2B, linha cinza).

Além disso, ao realizar a incubação em 1% de BSA para bloquear os sítios ativos remanescentes, houve ainda uma redução de 7% na corrente (Gráfico 2 B, linha amarela) em relação à etapa anterior, portanto, a adição de uma molécula de alta massa não condutora na superfície do eletrodo dificultou os processos redox da sonda com a superfície do eletrodo, indicando o bloqueio de sítios não específicos (YAN et al., 2018).

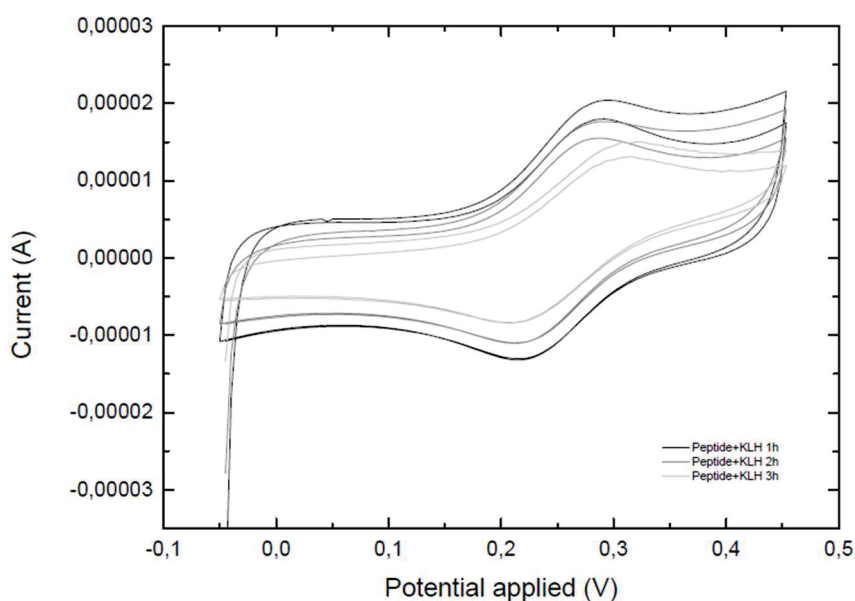
5.3 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS EXPERIMENTAIS

Os parâmetros avaliados para o biossensor desenvolvido para detecção do anticorpo dos pacientes, foram: a) otimização do tempo de conjugação dos peptídeos b) diluição das amostras de soro, c) pool de peptídeos vs pool de peptídeos carregados, d) concentração de peptídeo, e) otimização da concentração da sonda redox FCA utilizada no imunoensaio, e f) tempo de incubação da amostra. Todos os estudos de padronização foram realizados com amostras de pacientes de soroteca utilizando um exemplar de cada coorte: negativo (CN), paucibacilar (PB) e multibacilar (MB) de acordo com o diagnóstico clínico. A concentração de CS-MWCNT/BSA foi mantida constante em 1 mg mL^{-1} e 1%, respectivamente.

5.3.1 Otimização do tempo de conjugação do peptídeo

Uma etapa importante no desenvolvimento de um biossensor para triagem e/ou diagnóstico de doenças é a otimização do tempo e a concentração do elemento de bioreconhecimento sobre a superfície do biossensor. No gráfico 3, foi investigado o efeito do tempo de conjugação dos peptídeos carregados por meio da técnica de voltametria cíclica em temperatura ambiente de 21°C e em uma câmara úmida. O potencial foi varrido de $-0,05$ a $0,45\text{V}$ vs. $\text{Ag}|\text{AgCl}$. a uma taxa de varredura de $0,05 \text{ V s}^{-1}$. Os eletrodos foram avaliados com uma amostra simulada de PBS e 1 mmol L^{-1} de FCA após o período de 1 hora, 2 horas e 3 horas da conjugação.

GRÁFICO 3 - AVALIAÇÃO DO TEMPO DE INTERAÇÃO DOS PEPTÍDEOS



FONTE: A autora (2024). Estudo de voltametria cíclica para avaliar a conjugação de peptídeos em 1, 2 e 3 horas de interação. O potencial foi varrido de -0,05 a 0,45 V a uma taxa de varredura de 0.05 V s^{-1} .

Os resultados mostraram que, após 3 horas de interação, houve uma diminuição na corrente de pico, indicando que os peptídeos se conjugaram efetivamente à superfície dos MWCNTs. Essa diminuição da corrente está diretamente relacionada à conjugação das biomoléculas, pois a ligação dos peptídeos ao material nanoestruturado altera as propriedades eletroquímicas do sistema. Especificamente, os peptídeos podem formar uma camada que dificulta a transferência de carga na interface eletrodo/solução e bloqueia parcialmente a troca de elétrons entre o eletrodo e o mediador eletroquímico.

A análise dessa variação na corrente ao longo do tempo de interação é fundamental para determinar o tempo ideal de funcionalização do biossensor, garantindo um equilíbrio entre a conjugação eficiente dos peptídeos e a manutenção de uma boa resposta eletroquímica.

5.3.2 Diluição das amostras de soro

Amostras de soro de um controle negativo (NC), PB e MB foram preparadas em PBS pH 7,4 com diferentes diluições (1:10, 1:50, 1:100, 1:150 e 1:200).

A sonda eletroquímica de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de FCA foi utilizada em um sistema envolvendo um eletrodo de carbono modificado com CS-MWCNT's e peptídeos sintéticos previamente carregados imunorreativos para hanseníase. A configuração escolhida para o imunoensaio não apresenta marcação comumente utilizada para determinar indiretamente a concentração do biomarcador, como ocorre em ensaios tradicionais como o ELISA. Desta forma, uma sonda redox foi utilizada para monitorar a quantidade de biomarcador que interagiu com os peptídeos previamente imobilizados na superfície do SPCE. Quanto maior a quantidade do anticorpo específico (biomarcador) na amostra maior a dificuldade da sonda redox de difundir até a superfície do SPCE/CS-MWCNT e, conseqüentemente, menor o valor de corrente coletado (ATTA; GALAL; HASSAN, 2020).

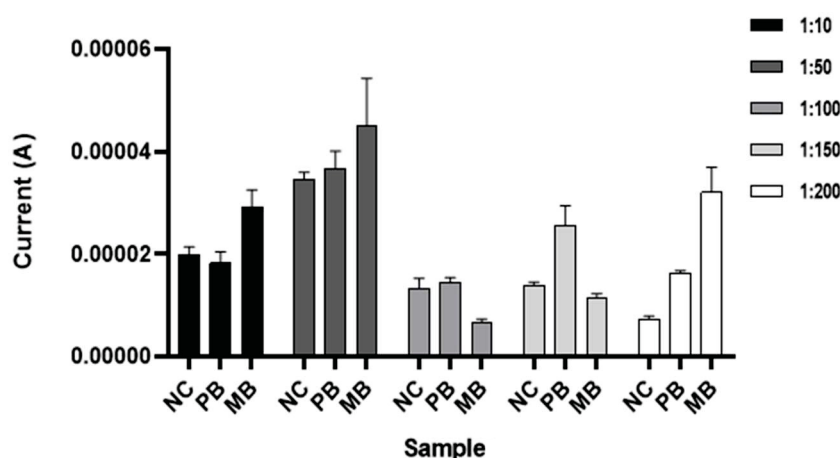
No momento da análise cada amostra de soro foi combinada diretamente com 1 mmol L^{-1} de FCA e aplicada sobre o eletrodo de trabalho (WE), juntamente com $40 \mu\text{l}$ de PBS (eletrólito de suporte). As amostras foram submetidas à voltametria de pulso diferencial (DPV) com potencial inicial de $-0,05\text{V}$ vs. $\text{Ag}|\text{AgCl}$ e final de $0,450\text{V}$ vs. $\text{Ag}|\text{AgCl}$. Cada amostra foi avaliada em quintuplicata.

O indivíduo classificado como MB apresenta uma resposta imunológica humoral com maiores títulos de anticorpos produzidos contra proteínas de *M. leprae*. Isso pode levar a uma interação específica com uma maior quantidade de peptídeos imunorreativos na superfície do eletrodo. Essa interação dificulta a transferência de carga entre o FCA e o CS-MWCNT, resultando em uma redução da corrente medida (REIBEL; CAMBAU; AUBRY, 2015; RIDLEY; JOPLING, 1966; WALKER; LOCKWOOD, 2006).

Essa relação inversa entre a quantidade de anticorpos e a corrente medida está intrinsecamente ligada à interação dos anticorpos com os peptídeos da hanseníase, os quais estão covalentemente ligados aos CS-MWCNT's recobrindo o eletrodo de carbono. Quanto maior for a quantidade de anticorpos na superfície do eletrodo, mais difícil será a transferência de carga durante a análise eletroquímica, resultando em uma redução na corrente medida. Por outro lado, em pacientes PB e pacientes negativos, que possuem uma menor quantidade de anticorpos ou ausência de anticorpos específicos, a interação dos anticorpos é reduzida, favorecendo a transferência de carga e resultando em uma corrente mais elevada (REIBEL; CAMBAU; AUBRY, 2015; RIDLEY; JOPLING, 1966; WALKER; LOCKWOOD, 2006).

No Gráfico 4, observamos que as diferentes diluições da mesma amostra não apresentam uma correlação linear. Isso pode indicar a ocorrência do fenômeno de prozona, em que a concentração de anticorpos é maior que a quantidade de peptídeos disponível. Esse efeito é mais evidente nas diluições 1:10 e 1:50, onde o alto título de anticorpos dificulta a ligação aos peptídeos, permitindo uma maior transferência de carga entre o FCA e os MWCNTs.

GRÁFICO 4 - AVALIAÇÃO DA DILUIÇÃO DAS AMOSTRAS



FONTE: A autora (2024). Avaliação da diluição das amostras NC, PB e MB, em que a diluição 1:100 mostrou-se ser a mais adequada para dar prosseguimento aos experimentos.

Na diluição 1:100, foi possível alcançar um equilíbrio entre as concentrações de peptídeo e anticorpo, verificando uma maior transferência de carga para as amostras NC e PB, e uma transferência menor para a amostra MB. Já na diluição 1:150, infere-se ter ocorrido um desfavorecimento para a amostra PB, devido à característica do paciente apresentar um título menor de anticorpos possivelmente resultando em um efeito de banda posterior (REIBEL; CAMBAU; AUBRY, 2015; RIDLEY; JOPLING, 1966; WALKER; LOCKWOOD, 2006). Na diluição 1:200, observamos o efeito contrário, onde a diluição afetou todas as amostras.

A forma PB da hanseníase sempre se apresentou como um desafio diagnóstico devido à resposta imunológica do hospedeiro, a quantidade diminuta de bacilos de *M. leprae* e sintomas mais localizados (REIBEL; CAMBAU; AUBRY, 2015; RIDLEY; JOPLING, 1966; WALKER; LOCKWOOD, 2006). O crescimento gradual e lento desses bacilos, aliado à diversidade de manifestações clínicas de caráter inespecífico, pode resultar em equívocos diagnósticos com outras condições de

ordem dermatológica ou neurológica. Essa dificuldade é recíproca, podendo levar tanto à confusão da hanseníase PB com outras enfermidades, quanto ao diagnóstico equivocado desta em casos similares (BRITTON; LOCKWOOD, 2004; SCOLLARD et al., 2006; VIRMOND; GRZYBOWSKI; VIRMOND, 2015).

5.3.3 Caracterização eletroquímica do *pool* de peptídeos vs *pool* de peptídeos carregados

Os três peptídeos foram utilizados em conjunto com a finalidade de aumentar a capacidade de reconhecimento pelos anticorpos presentes no soro de pacientes infectados pelo *M leprae*. Foi verificado no estudo de Soares e colaboradores (2021), que os peptídeos carregados na proteína KLH e avaliados isoladamente apresentaram alta sensibilidade e especificidade quando avaliados em ELISA. Assim, foi uma opção avaliar o conjunto desses peptídeos carregados no imunossensor eletroquímico.

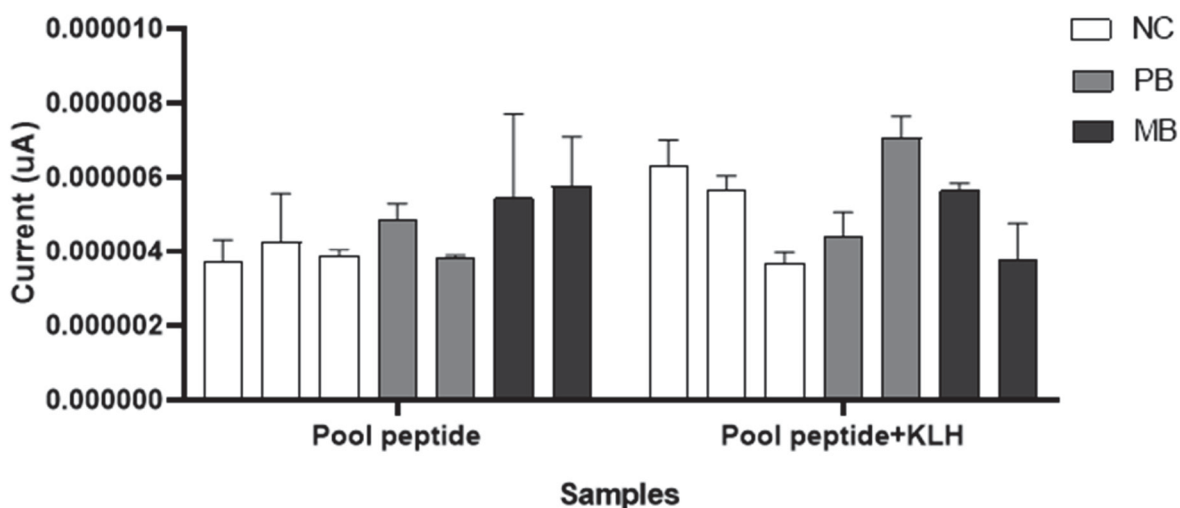
Os eletrodos foram preparados conforme o protocolo descrito anteriormente, com a diferença que um conjunto de eletrodos foi preparado com o pool de peptídeos e outro conjunto de eletrodos foi preparado com o pool de peptídeos carregados na proteína KLH, ambos na concentração de $21 \mu\text{g mL}^{-1}$.

A partir desse estudo, as amostras de soro humano deixaram de ser aplicadas sobre o eletrodo momentos antes da leitura eletroquímica e passaram a ser incubadas por 30 minutos, seguida de duas lavagens com PBS pH 7,4. Essa etapa de incubação da amostra acontece logo após a incubação com o BSA. Após a incubação da amostra, foram aplicados $100 \mu\text{L}$ de FCA $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e os eletrodos foram submetidas à voltametria de pulso diferencial (DPV) com potencial inicial de $-0,05\text{V}$ vs. Ag|AgCl e final de $0,450\text{V}$ vs. Ag|AgCl.

No Gráfico 5 observamos da esquerda para a direita a amostra NC 1 avaliada contra o pool de peptídeos e NC 1 – KLH avaliado contra os peptídeos carregados em KLH. Foram avaliadas três amostras de controle negativo, duas PB e duas MB. Foi observado que 66% das amostras negativas tiveram resultados mais condizentes quando o pool de peptídeos estava carregado na proteína KLH. Entre as amostras PB, uma amostra (50%) teve um ligeiro decréscimo de corrente, enquanto a outra amostra PB teve um aumento na corrente, indicando pouca quantidade de anticorpos e maior troca de elétrons entre o FCA e o CS-MWCNT. Nas amostras MB, pode-se observar resposta de uma amostra (50%) que teve um resultado de corrente menor, indicando

que mais anticorpos foram ligados a superfície do eletrodo e houve menor a troca de elétrons com o CS-MWCNT, ou seja, uma amostra positiva. Outra amostra MB testada contra o peptídeo carregado apresentou resultado semelhante ao peptídeo livre.

GRÁFICO 5 - POOL DE PEPTÍDEOS X POOL DE PEPTÍDEO CARREADO CONTRA AMOSTRAS NEGATIVAS, PB E MB



FONTE: A autora (2024). Avaliação do pool de peptídeos com o pool de peptídeos carregados contra amostras de soro negativas (3), PB (2) e MB (2).

Com base nesses resultados e desvio padrão relativo (RSD), os peptídeos carregados em KLH foram selecionados para seguirem os estudos seguintes.

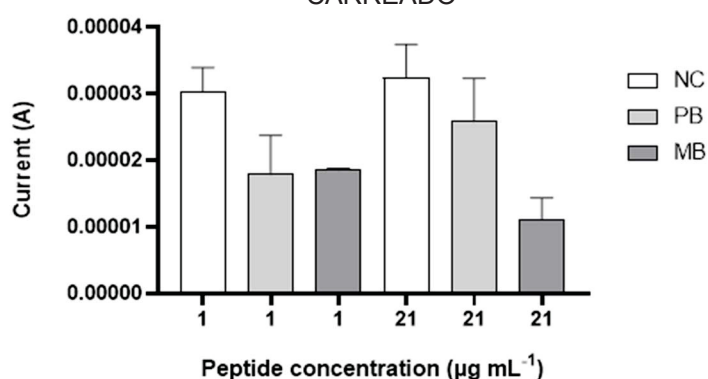
5.3.4 Avaliação da concentração de peptídeos carregados

Duas concentrações foram avaliadas, $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $21 \mu\text{g mL}^{-1}$. A concentração de $21 \mu\text{g mL}^{-1}$ foi justificada pelo estudo anterior do grupo em parceria com a Universidade Federal de São Carlos. Já a escolha de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ decorreu de um estudo cromatográfico de reconhecimento imunológico. Sendo os imunossensores eletroquímicos plataformas mais sensíveis, a concentração mais baixa foi considerada nesse estudo.

O gráfico 6 compara a corrente média para o controle negativo (NC), PB e MB. Para as amostras avaliadas com $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ o CV variou de 1,37 a 32,83% e para $21 \mu\text{g mL}^{-1}$ variou de 15,60 a 29,10%.

Apesar da magnitude de corrente observada no voltamograma de CV para ambas as concentrações ser similar, a concentração de peptídeos com $21 \mu\text{g mL}^{-1}$ permitiu separar a amostra NC da PB e MB, um dos objetivos almejados nesse estudo. Desta forma a concentração de peptídeo de $21 \mu\text{g mL}^{-1}$ foi selecionada para estudos posteriores.

GRÁFICO 6 - ESTUDO DE CONCENTRAÇÃO DO PEPTÍDEO CARREADO



FONTE: A autora (2024). Estudo da concentração de peptídeos carregados com 1 e $21 \mu\text{g mL}^{-1}$.

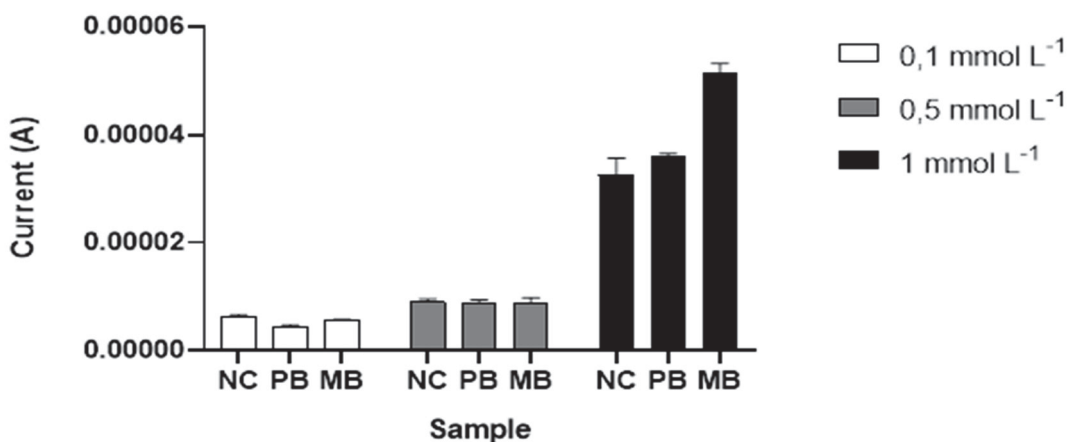
5.3.5 Otimização da concentração da sonda redox FCA utilizada no imunoensaio

A fim de verificar os efeitos da troca de elétrons decorrente da concentração da sonda redox e sua interação com o CS-MWCNT, foram avaliadas três concentrações de FCA: 0,1; 0,5 e $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de FCA, contra eletrodos modificados com o pool de peptídeos carregados e incubados por 30 minutos com amostras NC, PB e MB.

A escolha da concentração de $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ de FCA para as etapas seguintes do estudo foi fundamentada com base na análise dos resultados apresentados no Gráfico 7, que demonstraram uma relação proporcional entre a concentração de FCA e o incremento da corrente de pico.

No entanto, ao avaliar as diferenças na intensidade de pico entre as amostras NC e PB, a concentração de $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ apresentou um desvio de 30%, enquanto na concentração de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ o desvio foi ligeiramente menor, de 25%. Por outro lado, a concentração intermediária de $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ não mostrou diferenças estatisticamente significativas entre as amostras, o que sugere menor capacidade de discriminação entre os estados avaliados.

GRÁFICO 7 - OTIMIZAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA Sonda REDOX FCA



FONTE: A autora (2024). Avaliação da concentração de FCA após a incubação de amostras NC, PB e MB por 30 minutos.

Embora a concentração de 1,0 mmol L⁻¹ tenha apresentado desvios relativamente baixos, é fundamental considerar que concentrações mais elevadas podem intensificar o ruído de fundo e aumentar a densidade de corrente, comprometendo a análise de interações específicas. Além disso, concentrações elevadas da sonda podem provocar efeitos de saturação ou interações não específicas com a matriz, o que impacta negativamente a especificidade do biossensor (ZHANG et al., 2023).

Nesse contexto, observou-se que a corrente máxima associada à saturação da sonda redox (1 mmol L⁻¹) foi de aproximadamente 50 microamperes (μA). Em contraste, as correntes obtidas nas amostras analisadas com concentrações de 0,1 e 0,5 mmol L⁻¹ foram, respectivamente, 6 e 9 μA.

5.3.6 Tempo de incubação da amostra

O tempo de incubação da amostra afeta diretamente o desempenho analítico dos imunoenaios e, geralmente, depende das características cinéticas da imunorreação e da transferência de massa das biomoléculas. Os intervalos de tempo de incubação investigados foram de 5, 30 e 60 min, mantendo a concentração do peptídeo carregado em 21 μg mL⁻¹ e concentração de FCA em 0,1 mmol L⁻¹.

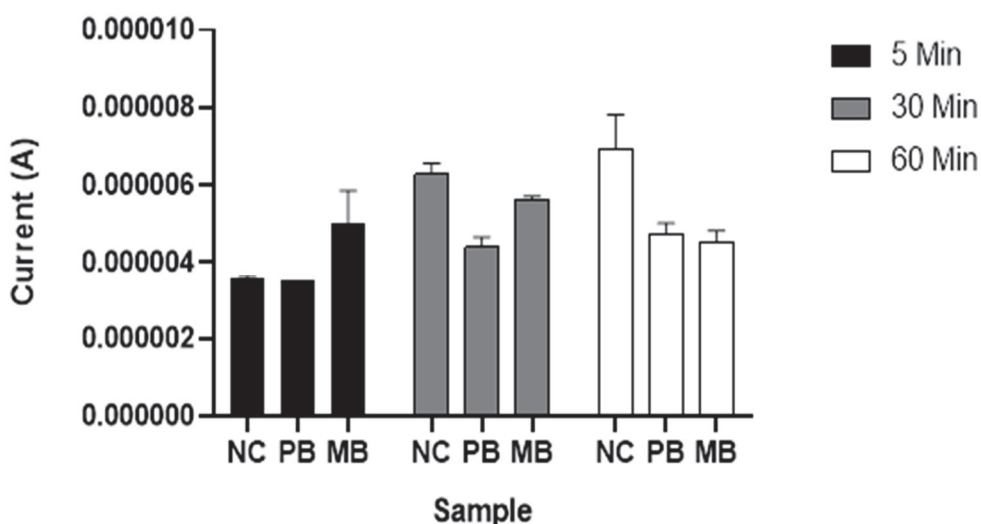
Os resultados da voltametria de pulso diferencial, obtidos em uma faixa de potencial de -0,05 a 4,5 mV vs. Ag|AgCl, mostraram uma variação na intensidade das

correntes, que foram aproximadamente 4, 6 e 7 μA para os tempos de incubação de 5, 30 e 60 minutos, respectivamente. Esses valores indicam um aumento gradual e consistente da intensidade da corrente com o tempo de incubação, refletindo a melhora na captura do biomarcador ao longo do tempo.

No Gráfico 7, foram avaliadas as correntes máximas e as obtidas em diferentes concentrações de FCA (0,1 e 0,5 mmol L^{-1}), com as correntes correspondendo a 6 μA e 9 μA , respectivamente. Esses dados demonstram que a concentração de FCA influencia diretamente a magnitude da corrente, enquanto o tempo de incubação regula a eficiência da captura do biomarcador. Assim, o Gráfico 8 reforça que, mesmo com concentrações menores de FCA, o tempo de incubação prolongado (60 min) permite uma separação mais clara entre as coortes, evidenciando uma maior especificidade e menor interferência não específica.

Portanto, o tempo de 60 minutos foi selecionado para a incubação na etapa de captura do biomarcador sendo este um tempo adequado para a realização do imunoensaio.

GRÁFICO 8 - TEMPO DE INCUBAÇÃO DA AMOSTRA



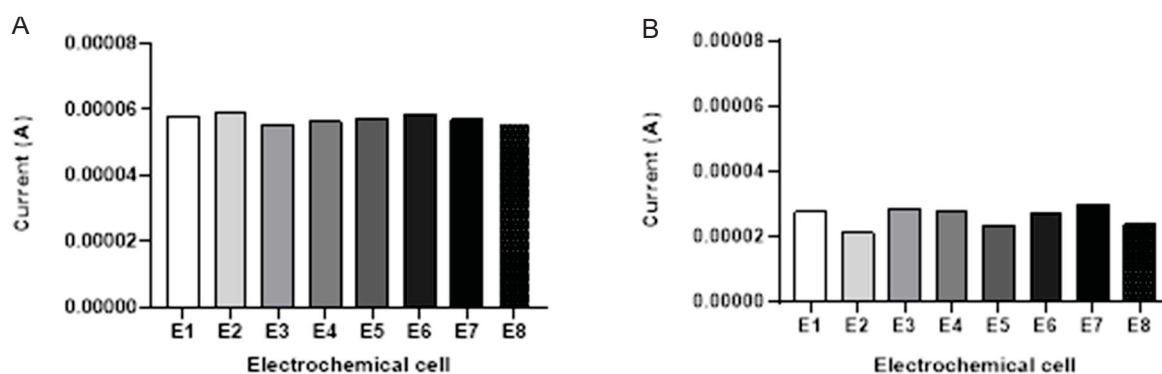
FONTE: A autora (2024). Estudo do tempo de incubação das amostras NC, PB e MB por tempo de 5, 30 e 60 minutos.

5.4 REPETIBILIDADE DO BIOSSENSOR

A repetibilidade é uma métrica fundamental na avaliação de biossensores, pois reflete a consistência dos resultados em múltiplas medições. A análise foi realizada

para dois tipos de eletrodos: não modificados (Gráfico 9 A) e modificados (Gráfico 9 B), com oito repetições, usando $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de FCA como sonda. A repetibilidade foi quantificada através do RSD das correntes medidas.

GRÁFICO 9 - REPETIBILIDADE DOS ELETRODOS SEM MODIFICAÇÃO E COM MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE



FONTE: A autora (2024). A) Eletrodos sem modificação e B) Eletrodos modificados SPCE/CS-MWCNT/PEP+KLH/BSA. Ambos foram medidos usando 1 mmol L^{-1} de FCA.

Os resultados mostraram valores de desvio padrão relativo (RSD) de 2% para o SPCE sem modificação, indicando alta repetibilidade e consistência nas medições. A corrente média de $57,2 \mu\text{A}$, relativamente alta, pode ser justificada pela ausência de camadas adicionais que poderiam oferecer resistência ou interferir na transferência de elétrons.

Para o eletrodo modificado (SPCE/CS-MWCNT/PEP+KLH/BSA), o RSD foi de 11% e corrente média de $26,2 \mu\text{A}$. Embora maior que o dos eletrodos não modificados, ainda é considerado aceitável para biossensores (JOHANSEN; LUNDSTRÖM; LIEBERG, 2000). A maior variabilidade pode ser atribuída às várias etapas de modificação, que podem introduzir variabilidade em cada camada.

Os resultados indicam que o método proposto para construção de eletrodos descartáveis além de simples e de baixo custo mostrou-se eficaz em termos de repetibilidade, bem como o método para a modificação dos eletrodos utilizando CS-MWCNT.

5.5 AVALIAÇÃO DO IMUNOSSENSOR NA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS EM AMOSTRAS DE PACIENTES

Resumidamente, as células eletroquímicas foram depositadas com 5 uL de uma solução de CS-MWCNT ($1,0 \text{ mg mL}^{-1}$), seguida da ativação dos grupos carboxílicos com EDC/NHS ($0,4 / 0,2 \text{ mol L}^{-1}$), conjugação por 3 horas do pool de peptídeos imunorreativos carregados na proteína KLH (APDD/PVSS/GTNV), seguida de 2 etapas de lavagem com PBS pH 7,4, incubação por 60 minutos com BSA 1%, seguida de 2 etapas de lavagem com PBS pH 7,4 e a etapa final com a interação de 60 minutos com as amostras de pacientes saudáveis e clinicamente diagnosticados como PB e MB para hanseníase, seguida de 2 etapas de lavagem com PBS pH 7,4.

Foram testadas 85 amostras, sendo 41 amostras de soro negativas para a doença, provenientes de região não endêmica e 44 pacientes positivos, sendo 20 PB e 24 MB.

Após o preparo, cada amostra foi avaliada em quintuplicata em um potenciostato multicanal com aparato desenvolvido para comportar 10 unidades por leitura eletroquímica.

Os eletrodos foram cuidadosamente posicionados em um suporte de acrílico de 2 mm, garantindo a estabilidade necessária durante as leituras. Foram avaliadas duas amostras por vez, em 6 dias consecutivos, sem considerar os finais de semana.

Após o tratamento estatístico dos dados, considerando um intervalo de confiança de 95%, foram selecionadas apenas as amostras que apresentaram pelo menos três replicatas dentro do intervalo e um desvio padrão relativo (RSD) inferior a 15%, valor considerado adequado para ensaios de diagnóstico. Nesse critério, 46 amostras foram aceitas, sendo 22 NC, 10 PB e 14 MB.

Para a variável "Corrente", foi realizada uma análise de variância (ANOVA) univariada, que demonstrou resultados significativos. Os valores extremamente elevados do parâmetro F (22122,66 para o efeito principal e 40,79 para o erro residual) e os valores-p próximos de zero indicam que há diferenças reais entre as médias dos grupos analisados. Esses resultados mostram que as variações observadas não são devidas ao acaso, mas sim a diferenças significativas nas correntes medidas entre os grupos NC, PB e MB.

O valor de F é calculado como a razão entre a variância explicada pelo modelo (diferenças entre os grupos) e a variância não explicada (variações dentro dos grupos). Quando os valores de F são altos, isso significa que a variância entre os grupos é muito maior do que a variância dentro dos grupos, confirmando que as diferenças são estatisticamente relevantes. Esses resultados reforçam a validade do

método no contexto de diagnóstico, demonstrando a capacidade do ensaio de distinguir efetivamente entre os grupos analisados.

O teste de Tukey HSD (Honest Significant Difference) foi aplicado para identificar quais grupos específicos diferem entre si. Os grupos homogêneos identificados pelo teste de Tukey são representados por letras (de 'a' a 'r'), mostrados na Tabela 1.

TABELA 1 - TESTE DE TUKEY COM 95% DE CONFIANÇA

Amostra	Corrente	a b c d e f g h i j k l m n o p q r	Agrupamento
MB1	0,000003	a	a
MB2	0,000003	a	a
NC1	0,000003	a	a
MB3	0,000003	a	a
MB4	0,000003	a b	ab
NC2	0,000003	a b	ab
PB1	0,000003	a b	ab
MB5	0,000004	a b c	abc
PB2	0,000004	a b c d	abcd
PB3	0,000004	a b c d e	abcde
PB4	0,000004	a b c d e	abcde
MB6	0,000004	a b c d e	abcde
MB7	0,000004	a b c d e	abcde
PB5	0,000004	a b c d e f	abcdef
NC3	0,000004	a b c d e f	abcdef
NC4	0,000004	a b c d e f	abcdef
NC5	0,000004	a b c d e f	abcdef
NC6	0,000004	a b c d e f g	abcdefg
NC7	0,000004	a b c d e f g	abcdefg
NC8	0,000004	a b c d e f g	abcdefg
NC9	0,000004	a b c d e f g	abcdefg
PB6	0,000005	b c d e f g h	bcdefgh
NC10	0,000005	b c d e f g h i	bcdefghi
PB7	0,000005	c d e f g h i	cdefghi
NC11	0,000005	c d e f g h i	cdefghi
PB8	0,000005	c d e f g h i j	cdefghij
NC12	0,000005	d e f g h i j k	defghijk
NC13	0,000005	d e f g h i j k l	defghijkl
MB8	0,000005	e f g h i j k l	efghijkl
NC14	0,000005	f g h i j k l	fghijkl
NC15	0,000005	f g h i j k l m	fghijklm
NC16	0,000005	f g h i j k l m	fghijklm
NC17	0,000005	g h i j k l m	ghijklm
MB9	0,000005	g h i j k l m	ghijklm

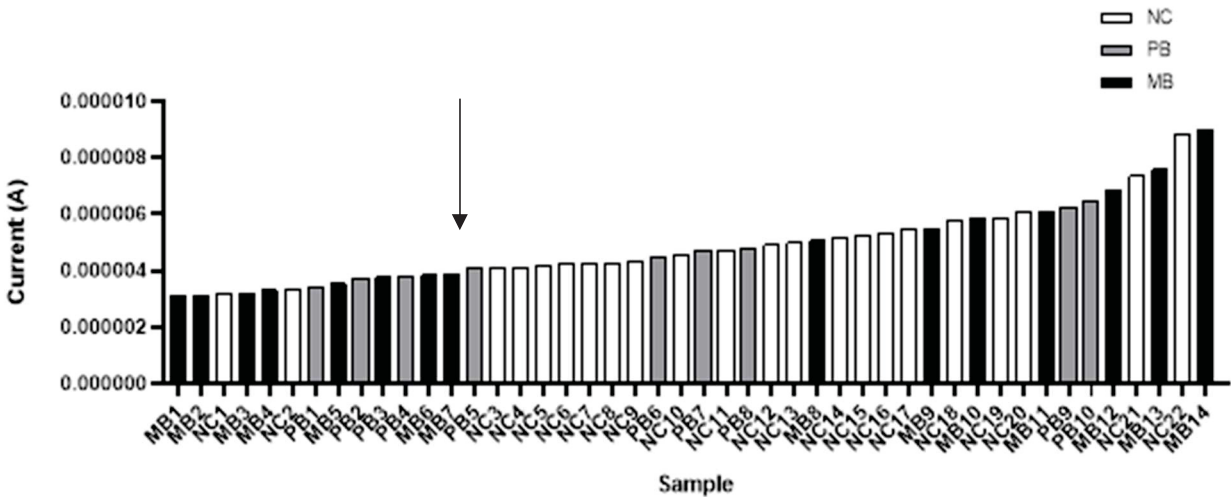
NC18	0,000006	h	i	j	k	l	m	n				hijklmn
MB10	0,000006		i	j	k	l	m	n				ijklmn
NC19	0,000006		i	j	k	l	m	n				ijklmn
NC20	0,000006			j	k	l	m	n	o			jklmno
MB11	0,000006				k	l	m	n	o			klmno
PB9	0,000006					l	m	n	o			lmno
PB10	0,000006						m	n	o	p		mnop
MB12	0,000007							n	o	p		nop
NC21	0,000007								o	p		op
MB13	0,000008									p	q	pq
NC22	0,000009										q	qr
MB14	0,000009											r

FONTE: A autora (2024).

O gráfico 10, mostra a classificação das amostras após o processamento dos dados. Foi calculada a corrente média resultante da oxidação do FCA e o desvio padrão relativo (RSD) entre as réplicas da amostra variou de 0,11% a 14,68%, valores considerados razoáveis, uma vez que a maioria dos estágios é totalmente artesanal.

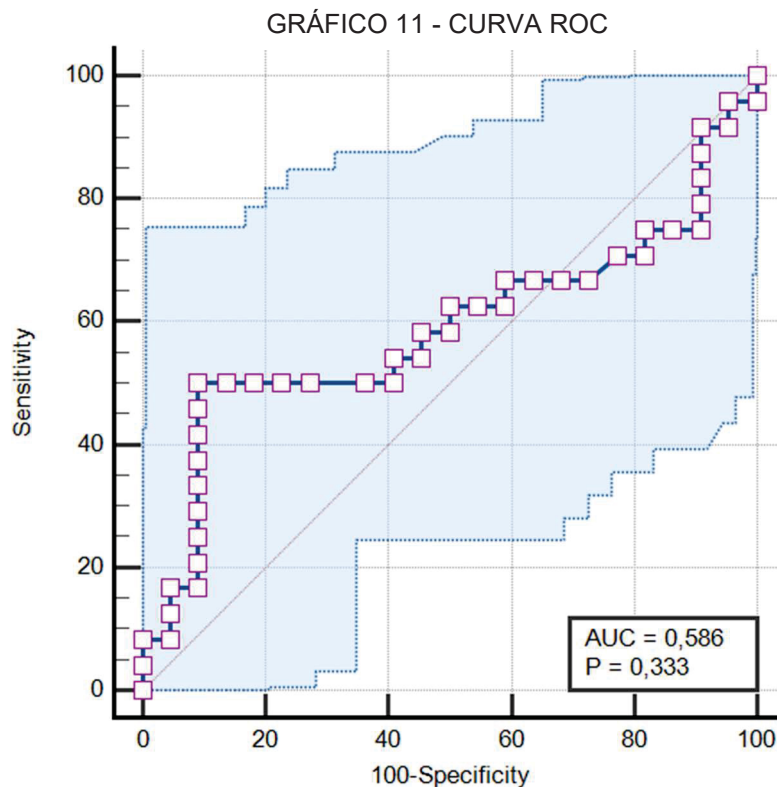
O ponto de corte (*cut-off*) para este teste foi $\leq 0,0000041$, ou seja, valores de corrente menores ou iguais a 0,0000041 são considerados positivos pelo teste e indicado pela seta no Gráfico 10.

GRÁFICO 10 - AMOSTRAS CLASSIFICADAS PELO TESTE DE TUKEY COM 95% DE CONFIANÇA



FONTE: A autora (2024). Amostras classificadas pelo Teste de Tukey, com 95% de confiança. A seta indica o ponto de corte entre amostras positivas e negativas. A seta indica o cut-off do teste, com amostras a esquerda, consideradas positivas e a esquerda da seta, negativas.

A área sob a curva ROC varia de 0 a 1, em que 1 indica um modelo perfeito. O Gráfico 11 mostra a AUC obtida de 0,586 sugerindo que o modelo tem uma capacidade discriminativa baixa e que o classificador tem uma capacidade baixa de distinguir entre amostras positivas e negativas. O índice de Youden é uma medida da eficácia de um teste diagnóstico.



FONTE: A autora, (2024).

O teste apresentou um valor de 0,4091, indicando que o modelo teve um desempenho moderado em termos de acurácia. A sensibilidade de 50%, indicou que o modelo conseguiu identificar corretamente apenas metade dos casos positivos (verdadeiros positivos) entre as amostras avaliadas. Esse resultado evidenciou uma limitação importante, já que houve uma alta probabilidade de falsos negativos.

Por outro lado, a especificidade de 90,91%, demonstrou que o modelo teve uma alta capacidade de identificar corretamente os casos negativos (verdadeiros negativos), reduzindo a ocorrência de falsos positivos. Essa alta especificidade foi uma característica valiosa, especialmente em contextos em que diagnósticos falsos positivos poderiam acarretar tratamentos desnecessários, custos adicionais ou gerar ansiedade nos pacientes.

No entanto, o desempenho geral do modelo revelou um viés maior na identificação de casos negativos em detrimento dos casos positivos. Essa limitação foi aceitável em situações em que a maioria das amostras era composta por casos negativos ou onde a confirmação de casos positivos poderia ser realizada com testes complementares mais específicos.

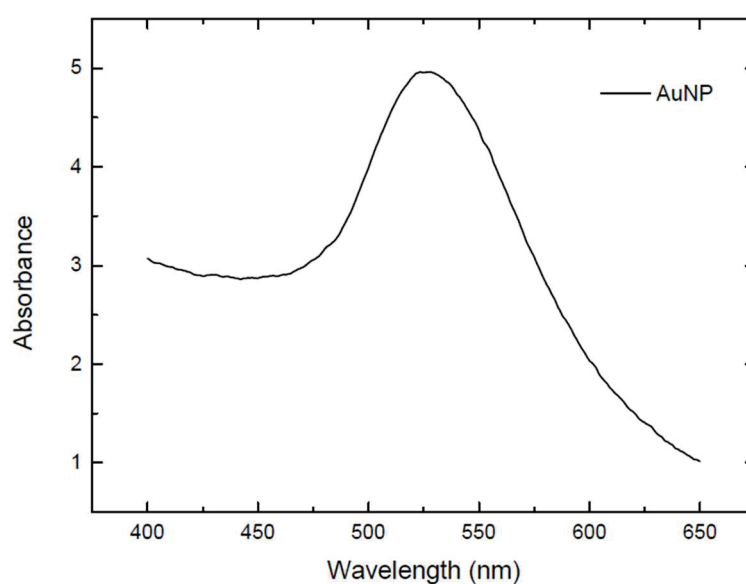
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO – LATERAL FLOW IMMUNOASSAY

6.1 CARACTERIZAÇÃO DA AUNP

6.1.1 Caracterização óptica por espectrofotometria de UV-Vis

O comprimento de onda de absorção das nanopartículas de ouro (AuNPs) em um espectrofotômetro depende do tamanho e da forma das nanopartículas. Para nanopartículas de ouro esféricas, a absorção geralmente ocorre em torno de 520 a 530 nm, que é onde o pico de ressonância de plasmons de superfície (SPR) é observado. Para medir a absorção das nanopartículas de ouro, a solução de AuNPs é colocada em uma cubeta ou depositada no leitor do nanoespectrofotômetro. A leitura do espectrofotômetro / nanoespectrofotômetro fornecerá um espectro de absorção, e o pico de absorção máximo observado. Este comprimento de onda específico é indicativo da interação dos plasmons de superfície das nanopartículas com a luz, um fenômeno que é fortemente dependente do tamanho, forma e ambiente das nanopartículas (MAJERIČ et al., 2023).

GRÁFICO 12 - FORMAÇÃO DA AUNP OBSERVADA NO NANOESPECTROFOTÔMETRO



FONTE: A autora, (2024)

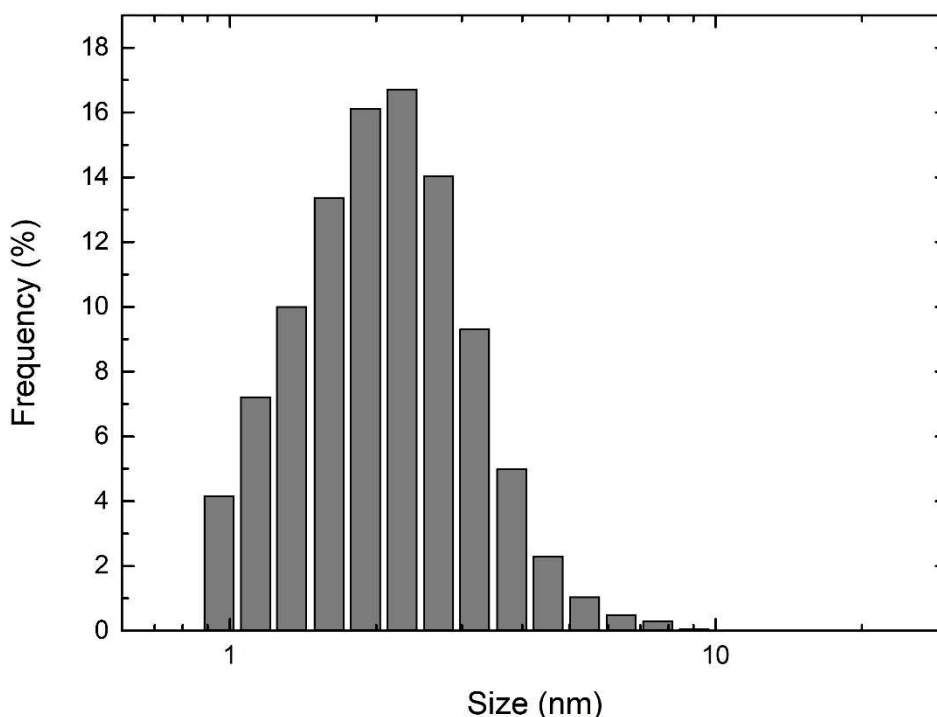
No Gráfico 12 é observada a formação da AuNP pela síntese proposta com a visualização do pico no comprimento de onda de 523,5 nm e D.O. 4.96, indicando a formação das nanopartículas esféricas pela síntese química.

O rendimento das NP foi calculado com 3 replicatas de 1 mL preparadas e tomadas as massas em microtubo de baixa aderência, e após a secagem completa em estufa foram tomadas as massas dos três microtubos em balança analítica de precisão, resultando, em média de 0,67 mg mL⁻¹.

6.1.2 Caracterização da AuNP por espalhamento dinâmico de luz (DLS)

O espalhamento dinâmico de luz (DLS) é uma ferramenta analítica usada rotineiramente para medir o tamanho hidrodinâmico de nanopartículas e coloides em suspensão (JANS et al., 2009). As distribuições de tamanho baseadas na intensidade das nanopartículas de ouro obtidas pelo DLS estão apresentadas no histograma abaixo, Gráfico 13, com tamanhos variando de 0 a 10 nm, sendo que a maior concentração de nanopartículas tem entre 1,60 e 2,69 nanômetros.

GRÁFICO 13 - DIATRIBUIÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS POR TAMANHO



FONTE: A autora (2024).

6.2 OTIMIZAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE AUNP E DO ANTICORPO

6.2.1 Otimização da concentração do anticorpo anti IgG murina – linha controle

Um par de anticorpo murino e anti IgG murina foi utilizado com a finalidade de avaliar: a concentração das biomoléculas ideal bem como a conjugação com o ouro, as membranas e a interação entre eles.

A conjugação eletrostática ou adsorção física ocorreu com quatro diferentes concentrações da solução de AuNP e quatro concentrações de IgG murina (Tabela 2). Esse processo envolve a imobilização de moléculas de detecção nas superfícies de nanopartículas de metais nobres através de interações hidrofóbicas, eletrostáticas, ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals (RAZO et al., 2021).

TABELA 2 - DESENHO EXPERIMENTAL DA OTIMIZAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE IgG E AuNP

Teste	AuNP (µL)	Água (µL)	D.O. em 523,5 nm	[] IgG (µg mL ⁻¹)	Vol. IgG (µL)
Teste 1	1000	0	4,96	29	16,38
Teste 2	700	300	3,35	21	11,86
Teste 3	500	500	2,37	15	8,47
Teste 4	300	700	1,45	9	5,08

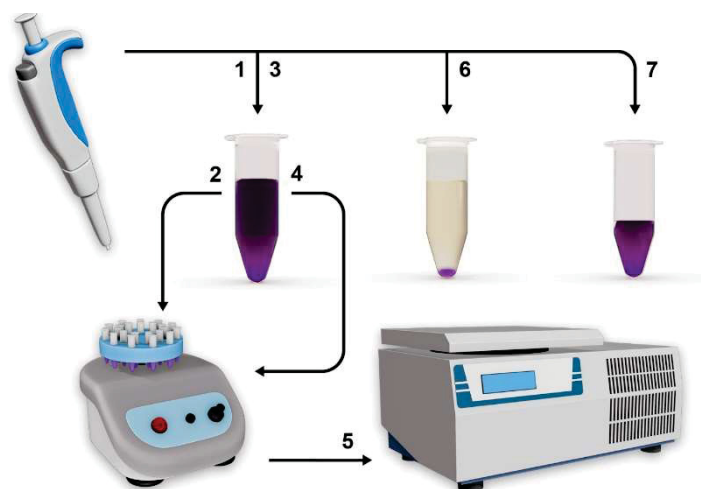
FONTE: A autora (2024).

Resumidamente, cada tubo com a solução de ouro foi preparado separadamente. Após calcular as concentrações de IgG, cada teste foi ajustado para um volume final de 1,0 mL de solução de ouro, ao qual foi adicionado o volume apropriado de IgG murina, conforme indicado na Tabela 2.

A solução foi então agitada levemente em um vórtex a 700 rpm por 30 minutos. Em seguida, foram adicionados 100 µL de solução de BSA a 1% e 0,5% Tween 20, preparada em água Milli-Q, com mais 30 minutos de agitação leve em vórtex.

Após essa etapa, os tubos foram centrifugados por 30 minutos a 14.000 rpm a -4 °C. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado em 300 µL de tampão de ressuspensão, conforme mostrado na Figura 11.

FIGURA 11 - PREPARAÇÃO DO CONJUGATE PAD



FONTE: A autora (2024). Para o avaliar a melhor concentração do par IgG murina x anti IgG murina na linha teste, cada tubo foi ajustado para um volume final de 1,0 mL de solução de ouro (1), ao qual foi adicionado o volume apropriado de IgG murina (3). Após uso de vórtex (2) e adição de BSA a 1% e 0,5% Tween 20 e novo vórtex (4), os tubos foram centrifugados (5). O sobrenadante foi descartado (6) e o pellet ressuspensionado (7).

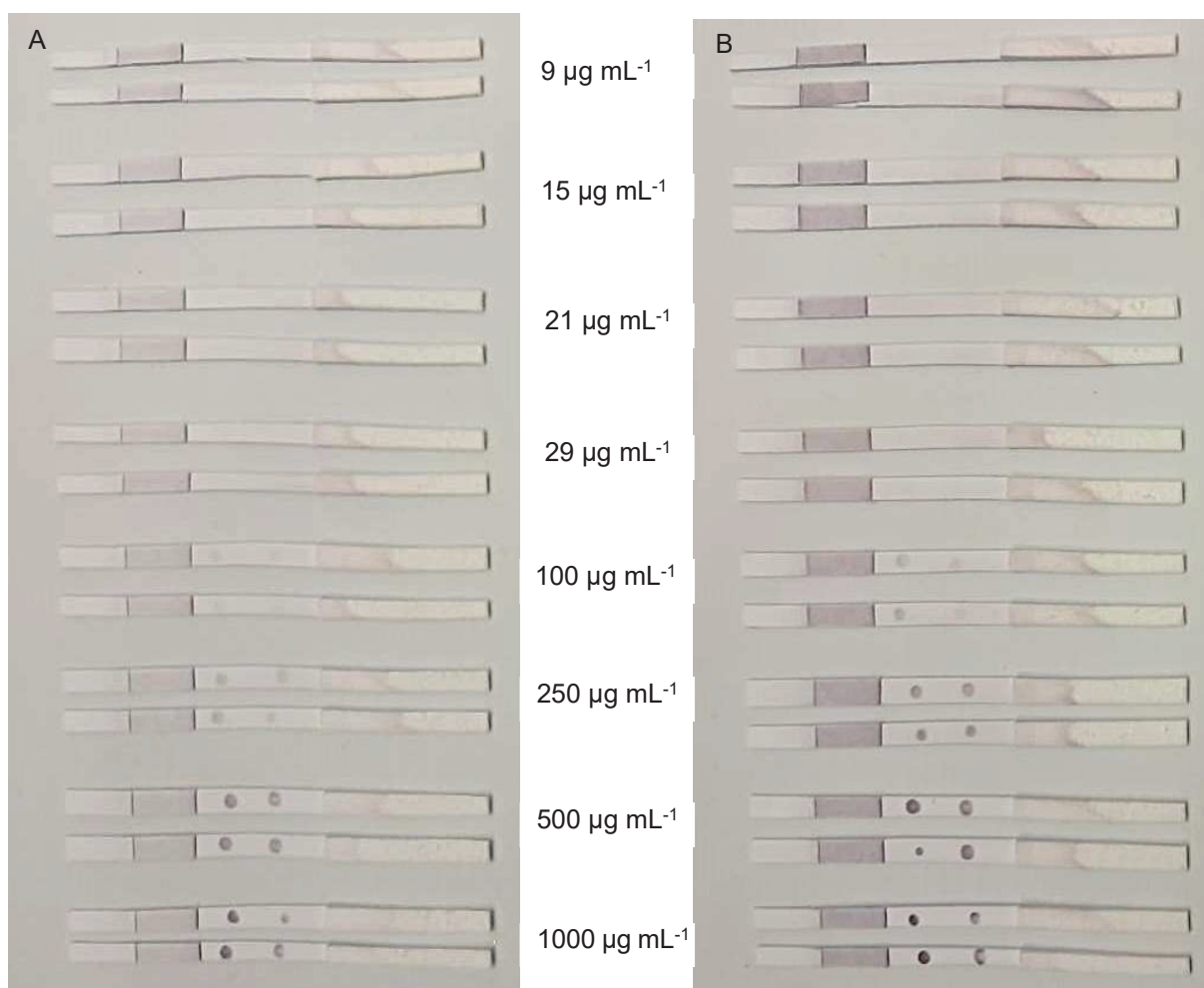
O tampão de ressuspensão foi preparado com: 5% de sacarose, 1% de BSA, 0,5% de Tween-20 e QSP de PBS 10 mmol L⁻¹. O ouro conjugado com anticorpo de cada um dos 4 testes foi depositado em 4 *conjugate pad's* e mantido em sala com umidade e temperatura controlados, para a secagem, por 24 horas com umidade variando de 30 a 40%.

Após a montagem e corte das tiras, com 5 mm de largura, cada grupo de teste foi separado e aplicado 0,7 µL de anticorpo anti IgG murina em dois pontos, na LT e LC. As concentrações avaliadas de IgG anti-*mouse* para cada teste foram: 9, 15, 21, 29, 100, 250, 500 e 1000 µg mL⁻¹. Após a secagem das tiras em sala com umidade e temperatura controladas, foram aplicados 40 µL de uma solução tampão comercial (padrão) e após 5 minutos, aplicados mais 60 µL da mesma solução para cada tira, em duplicata. Depois de 15 a 30 minutos os resultados foram visualizados.

Nesse experimento foi utilizado apenas a IgG murina e anti-IgG murina e os dois pontos (LT e LC) foram depositados na mesma concentração para cada tira. Então, para o resultado positivo, ou seja, com a interação entre IgG de camundongo e anti-IgG de camundongo os dois pontos devem estar marcados com a coloração da AuNP e, em caso negativo, os dois pontos devem estar sem a coloração.

A Figura 12 apresenta os resultados de dois testes: o Teste 1 (12 A), à esquerda, onde foram depositados 29 $\mu\text{g/mL}$ de IgG murino no conjugate pad, e o Teste 2 (12 B), à direita, com 21 $\mu\text{g/mL}$ de IgG murino. Na membrana de nitrocelulose, diferentes concentrações de IgG anti-murino foram aplicadas na linha de teste (LT) e na linha de controle (LC).

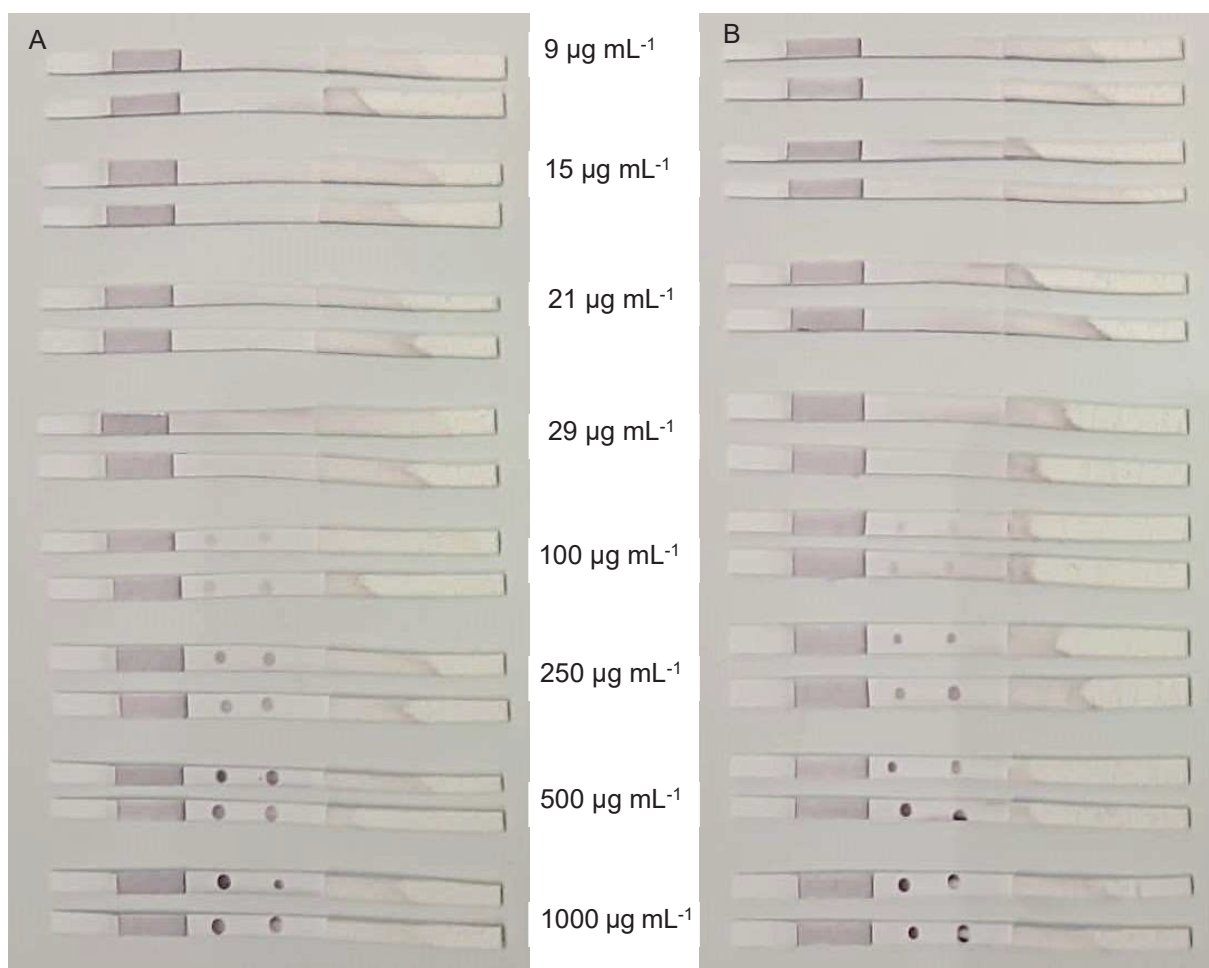
FIGURA 12 - AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE AUNP E IMUNOGLOBULINA G – MURINO E ANTI MURINA NOS TESTES 1 E 2



FONTE: A autora (2024). Nas tiras A e B com *conjugate pad* com 29 e 21 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de IgG murino, respectivamente, foram imunorreativos nas concentrações 100, 250, 500 e 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de IgG anti murina.

Na figura 13, foram mostrados os resultados dos testes 1 (13 A) nos quais foram depositados 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de IgG murino no *conjugate pad* e o teste 2 (13 B), com 9 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de IgG murino. Na nitrocelulose foram avaliadas concentrações 9 a 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ do IgG anti murina na LT e LC.

FIGURA 13 - AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE AUNP E IgG MURINA E ANTI IgG MURINA NOS TESTES 3 E 4



FONTE: A autora (2024). Nas tiras A e B com *conjugate pad* com 15 e 9 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de IgG murino, respectivamente, foram imunorreativos nas concentrações 100, 250, 500 e 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de IgG anti murina.

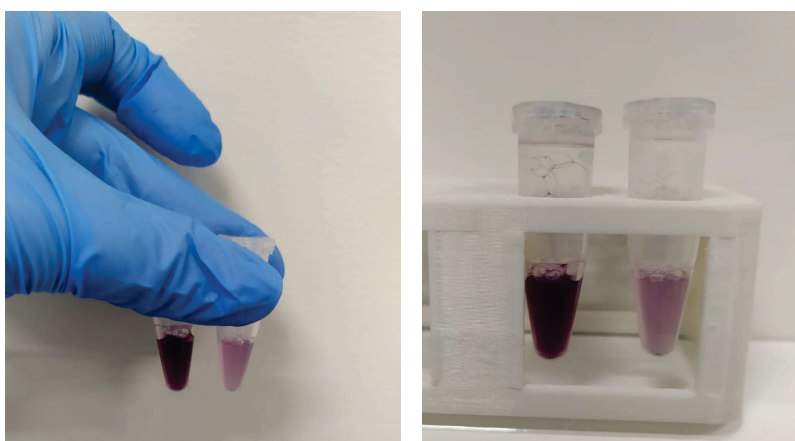
Todos os testes foram reativos para as concentrações de anti IgG murina de 100, 250, 500 e 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. No entanto, o teste 4, que utilizou AuNP com D.O. 1,45 e concentração de 9 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de IgG de camundongo, mostrou-se reativo nas mesmas concentrações que os testes 1, 2 e 3. Apesar de usar menor quantidade de anticorpo e ouro, o teste 4 foi tão eficiente em reconhecer e marcar o alvo quanto a tira com maior quantidade de ouro e anticorpo.

Os testes seguintes, foram preparados com concentração de 9 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de IgG mouse e a D.O. 1,45 de acordo com a diluição mostrada na Tabela 3. Para assegurar a visualização da LC, foi definida a concentração de 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de IgG anti camundongo.

6.2.2 Otimização das condições do ensaio

Duas concentrações do *pool* de peptídeos foram preparadas como mencionado anteriormente. As concentrações testadas foram 21 e 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A concentração de 21 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foi utilizada anteriormente para o biossensor eletroquímico e avaliada nesse experimento e uma concentração alta, de 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ com o propósito de aumentar a conjugação com a nanopartícula de ouro e otimizar o sinal. Após as etapas de bloqueio com 1% de BSA / 0,5% de Tween 20 e ressuspensão com 300 μL de tampão de ressuspensão, os tubos apresentaram colorações diferentes: à esquerda o tubo com 21 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e a direita, com 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 14). Foram preparados tubos com IgG murina na concentração de 9 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para servirem de controle no teste.

FIGURA 14 - INTERAÇÃO ELETROSTÁTICA ENTRE NANOPARTÍCULA DE OURO E POOL DE PEPTÍDEOS (21 E 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$)



FONTE: A autora (2024). Após as etapas de bloqueio com 1% de BSA / 0,5% de Tween 20 e ressuspensão com 300 μL de tampão de ressuspensão, os tubos apresentaram colorações diferentes: à esquerda o tubo com 21 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e a direita, com 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$

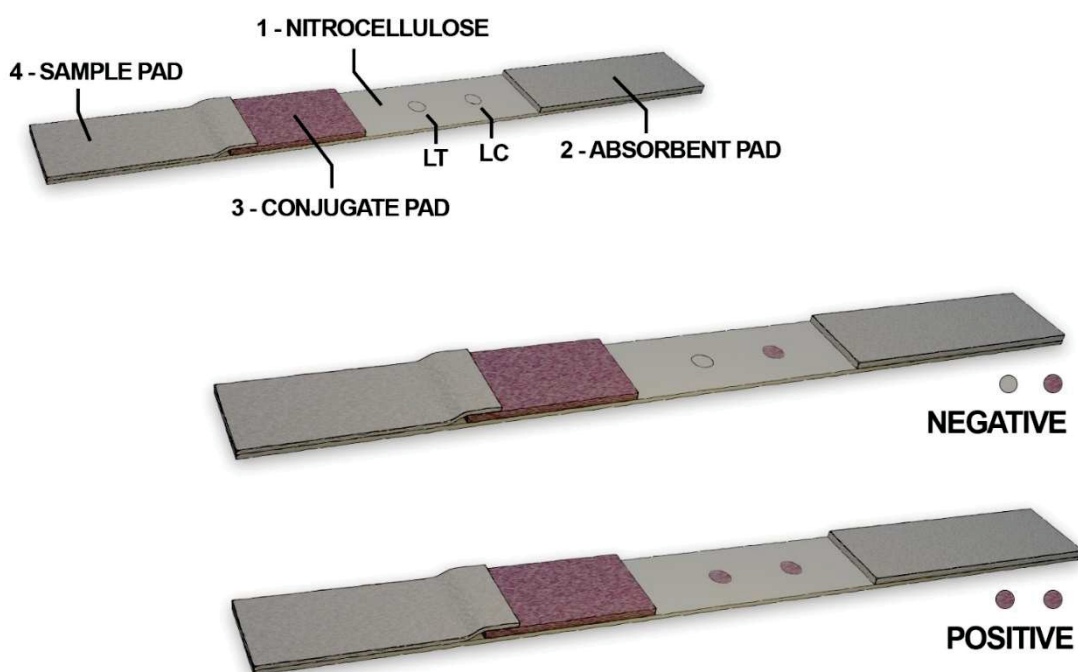
Concentrações mais altas do peptídeo podem neutralizar as cargas superficiais das AuNPs, reduzindo a repulsão eletrostática entre as partículas promovendo a aglomeração (LI et al., 2014).

As tiras foram montadas e depositadas na LT com 0,7 μL de anti IgG humana preparado em PBS pH 7,4 em 6 diferentes concentrações: 100, 200, 300, 400, 500 e 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Essa configuração foi confrontada com um *pool* de quatro amostras positivas MB, identificadas pelo diagnóstico clínico. Esse pool foi preparado com

quantidades iguais de cada soro e posteriormente foram preparadas 4 diluições, sendo: 1:10, 1:20, 1:40 e 1:100. Todas as condições foram avaliadas.

Sobre o *sample pad*, foram aplicados 10 μL do *pool* de soro positivo nas diluições acima descritas e após 20 minutos, foram adicionados 50 μL do tampão de corrida e após 15 minutos, foram visualizados os resultados, conforme foi ilustrado na Figura 15.

FIGURA 15 - ILUSTRAÇÃO DE TESTE POSITIVO E NEGATIVO



FONTE: A autora (2024). 1- Conjugate pad depositado com AuNP / Peptídeos e AuNP / IgG murino, LT – adsorvido com IgG anti-humano e LC - adsorvido com IgG anti murina – Amostras aplicadas no sample pad e após 20 minutos de interação foi aplicado o tampão de corrida. Amostra negativa apenas a LC é visível e amostra positiva com a LT e LC visíveis.

As tiras em cujo *conjugate pad* foram depositados $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ de peptídeos não foi reativa em nenhuma das concentrações da linha teste, nas diluições 1:10 e 1:20 do *pool* de soro positivo. Na diluição 1:40 as concentrações de 400, 500 e $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ apresentaram reatividade muito baixa, com pontos muito claros, quase imperceptíveis. Na diluição 1:200 as concentrações de anti IgG humana de 300, 400, 500 e $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ também apresentaram baixa reatividade, quase imperceptíveis.

O aumento da quantidade de peptídeo não favoreceu a captura, isso pode ser devido a vários fatores, como a diferença na estabilidade coloidal e a influência do pH na carga superficial da nanopartícula e até mesmo a interação peptídeo-peptídeo (LI et al., 2014).

Nas tiras preparadas com o *conjugate pad* depositado com $21 \mu\text{g mL}^{-1}$ e testadas as mesmas condições, foi observado que na diluição 1:20 as concentrações de 300, 400, 500 e $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ apresentaram uma reatividade muito baixa, com pontos muito claros, inclusive mais claros que o da diluição 1:10. Na diluição 1:40, as concentrações de 400 e $500 \mu\text{g/mL}$ apresentaram uma reatividade muito baixa, com pontos muito claros, quase imperceptíveis. A concentração de $1000 \mu\text{g/mL}$ foi um pouco mais reativa. Na diluição 1:100, a concentração de 300, 500 e $1000 \mu\text{g/mL}$ foram pouco reativas e a concentração de $400 \mu\text{g/mL}$ foi um pouco mais reativa.

Com base nesses resultados, optamos pela concentração de $21 \mu\text{g mL}^{-1}$ do *pool* de peptídeos e diluição do *pool* da amostra positiva de 1:100 e $400 \mu\text{g/mL}$ de anti IgG humana para a captura na nitrocelulose.

A mesma condição foi testada com o *pool* de 4 amostras de soro negativo. Tanto as amostras positivas quanto negativas para a hanseníase foram reativas na linha teste, indicando que um excesso de peptídeos possa ter causado um efeito prozona ou propiciado uma reatividade inespecífica.

Após esses resultados, muitos ajustes foram necessários. A partir desse ponto, duas amostras foram selecionadas, uma positiva (MB) e outra negativa (NC) para servirem como controle. Então foram avaliadas diferentes concentrações de anti IgG humana depositadas na nitrocelulose, diferentes concentrações do *pool* de peptídeo carregado em KLH e sem carrear, diferentes tampões de reação (corrida), diferentes concentrações de BSA para o bloqueio mais eficiente da AuNP e diferentes diluições das amostras de soro positivas e negativas, até encontrar a melhor condição para o teste. O resumo das condições avaliadas foi apresentado na Tabela 3.

TABELA 3 - CONDIÇÕES AVALIADAS NO LATERAL FLOW

Tampão de corrida	IgG anti humano ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Peptídeos ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Peptídeos + KLH ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Diluição da amostra	Tempo de interação da amostra (min)	% de BSA no bloqueio
1	100	1	1	Sem diluição	Aplicação direta	1%

2	200	2	2	1:10	10	0,5%
3	300	21	-	1:20	15	10%
4	400	200	-	1:30	30	-
5	500	-	-	1:40	-	-
-	800	-	-	1:50	-	-
-	900	-	-	1:80	-	-
-	1000	-	-	1:100	-	-
-	-	-	-	1:200	-	-
-	-	-	-	1:300	-	-

FONTE: A autora (2024).

Os tampões de corrida avaliados foram:

1 – Tampão de ressuspensão (1% BSA + 5% sacarose + 0,5% Tween 20 + PBS 10 mmol L⁻¹), pH 7,4 – 8,2;

2 – Comercial, pH 9,0;

3 – KHCO₃ (10 g), caseína (1 g), NaCl (4 g), Na₂HPO₄ (1,45 g), KH₂PO₄ (0,1 g), KCl (0,1 g), NaN₃ (0,5 g) qsp para 1 L, pH 7,4 – 8,2;

4 – Hepes 200 mmol L⁻¹, 1% Tween 20, qsp PBS mmol L⁻¹, pH 7,4 – 8,2 e

5 – Hepes 150 mmol L⁻¹, 0,075% Triton-100 X, 1% Tween 20, qsp PBS 10 mmol L⁻¹, pH 7,4 – 8,2.

Após a avaliação de todas as condições, inclusive da aplicação da amostra (sobre o *sample pad*, *conjugate pad* e em solução com o tampão) o tampão que apresentou um fluxo mais adequado para a interação das moléculas foi o tampão comercial (2), a melhor concentração de anti IgG humana para a captura foi a de 900 µg mL⁻¹, entre os peptídeos carregado e não carregado, a concentração de 2 µg mL⁻¹ do peptídeo carregado em KLH apresentou sinais mais evidentes na LT, a amostra foi mais reativa na proporção 1:11 com o bloqueio da AuNP com 1% de BSA e 0,5% de Tween 20. A influência da concentração do Tween 20 não foi avaliada.

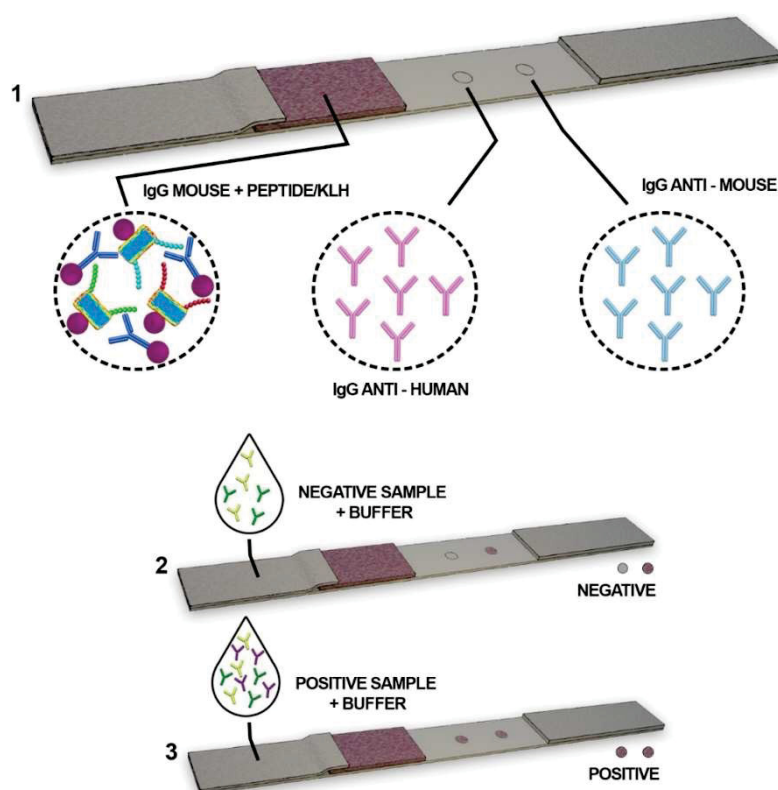
6.3 AVALIAÇÃO DO LFIA COM AMOSTRAS REAIS

Quarenta e seis amostras previamente testadas no biossensor foram reavaliadas no LFIA. Foram incluídas 24 amostras positivas (10 PB e 14 MB) e 22 negativas. Duas amostras MB, sem volume suficiente, foram substituídas por outras aleatórias do mesmo tipo.

Preparou-se uma solução de AuNP com DO 1,45 em comprimento de onda de 525 nm e outra com peptídeos carregados em PBS (pH 7,4). A mistura de AuNP e peptídeos (2 µg/mL) e outra com AuNP e IgG murina (9 µg/mL) foram agitadas suavemente por 30 minutos, bloqueadas com BSA e Tween 20, e centrifugadas para ressuspensão em tampão. O conjugate pad seco foi montado e as tiras cortadas, com aplicação de anticorpo anti-IgG humana e anti-IgG murina.

Após 24 horas, as amostras foram preparadas em duplicata para as tiras. Aplicaram-se 40 µL da solução, seguidos de mais 60 µL após cinco minutos. Os resultados foram lidos após 30 minutos, conforme ilustrado na Figura 16.

FIGURA 16 - CONFIGURAÇÃO DO LFIA APÓS A PADRONIZAÇÃO E APLICAÇÃO COM AMOSTRAS REAIS

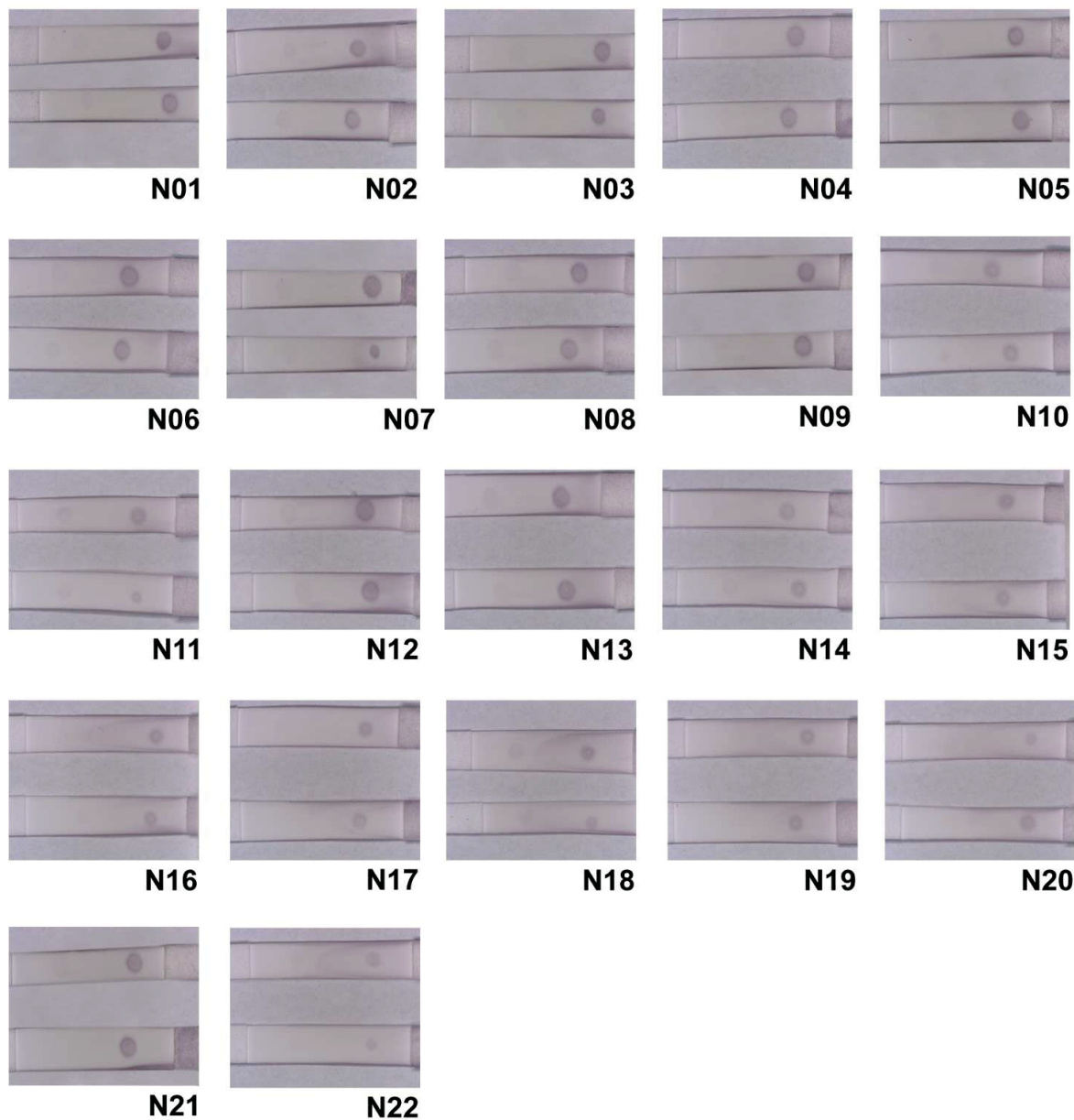


FONTE: A autora (2024). 1- Conjugate pad depositado com AuNP / Peptídeos+KLH e AuNP / IgG murino, LT – adsorvido com IgG anti-humano (rosa) e LC - adsorvido com IgG anti murina (azul claro). 2 – Amostra negativa em solução com tampão de corrida, aplicada no *sample pad* e 3 - Amostra positiva em solução com tampão de corrida, aplicada no *sample pad*.

As imagens dos testes foram feitas em microscópio estéreo modular com aumento de 5,3 vezes e abertura de luz de 44,0 mm. Os resultados dos pacientes classificados clinicamente como negativos e submetidos ao teste são mostrados na

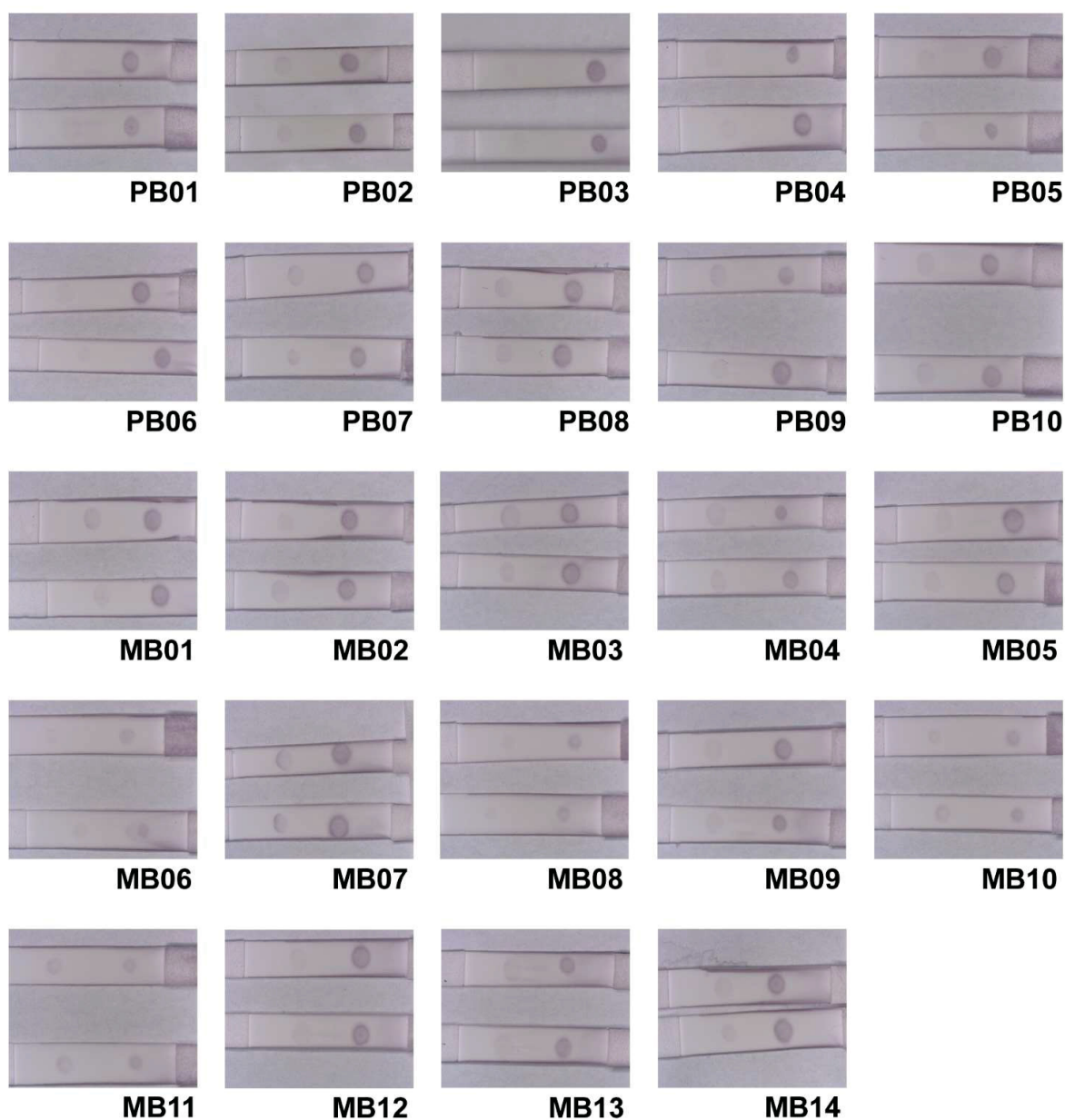
Figura 17 e na Figura 18, são mostrados os resultados do teste com os pacientes positivos, PB e MB.

FIGURA 17 - TESTE COM AMOSTRA REAL DE PACIENTES CONTROLE NEGATIVOS



FONTE: A autora (2024). Imagem do resultado, em duplicata, de 22 amostras de voluntários saudáveis, ou seja, negativos (N) quanto à presença de anticorpos anti proteínas de *M. leprae* em seu soro. Nota-se a coloração na linha controle em ambas as duplicatas indicando a correta migração dos componentes pela membrana de nitrocelulose.

FIGURA 18 - TESTE COM AMOSTRA REAL DE PACIENTES POSITIVOS (PB E MB)



FONTE: A autora (2024). Imagem do resultado, em duplicata, de 14 amostras de pacientes hansenianos classificados como paucibacilares (PB, n=10) e multibacilares (MB, n=14), ou seja, positivos quanto à presença de anticorpos anti proteínas de *M. leprae* em seu soro. Nota-se a coloração na linha teste em diferentes gradações. A coloração da linha controle indica a correta migração dos componentes, entretanto com maior intensidade do que a linha teste na maioria das duplicatas

6.4 QUANTIFICAÇÃO DOS TESTES COLORIMÉTRICOS

Testes de lateral flow são dispositivos simples e portáteis que detectam a presença de substâncias específicas em uma amostra. Esses testes são amplamente

utilizados em diagnósticos médicos, segurança alimentar, monitoramento ambiental e outras aplicações industriais.

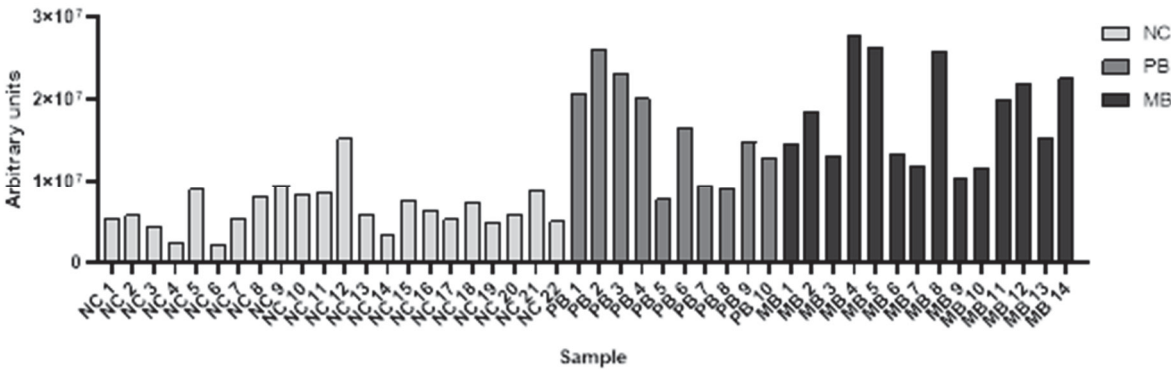
A quantificação precisa desses biomarcadores é importante para o diagnóstico de doenças, monitoramento de condições crônicas e ajuste de tratamentos médicos. A capacidade de quantificar resultados em testes colorimétricos, é suportada por avanços tecnológicos em instrumentação analítica e metodologias de análise. Dispositivos de leitura digital e softwares avançados permitem a interpretação precisa dos resultados dos testes, minimizando a subjetividade e o erro humano.

O software ImageJ é uma ferramenta de processamento de imagem de código aberto amplamente utilizada em análises biológicas e médicas para quantificar e analisar imagens obtidas de diferentes tipos de testes e experimentos.

As tiras foram fotografadas com a mesma exposição de luz e depois analisadas no software ImageJ. As imagens foram convertidas para escala de cinza usando a função 8-bit. A área da nitrocelulose com os pontos da LT e LC foi selecionada e mensuradas para obter valores de intensidade de pixel.

A média dos valores de cada amostra foi calculada e ilustrada no Gráfico 14.

GRÁFICO 14 - INTENSIDADE CALCULADA DAS AMOSTRAS EM PIXEL



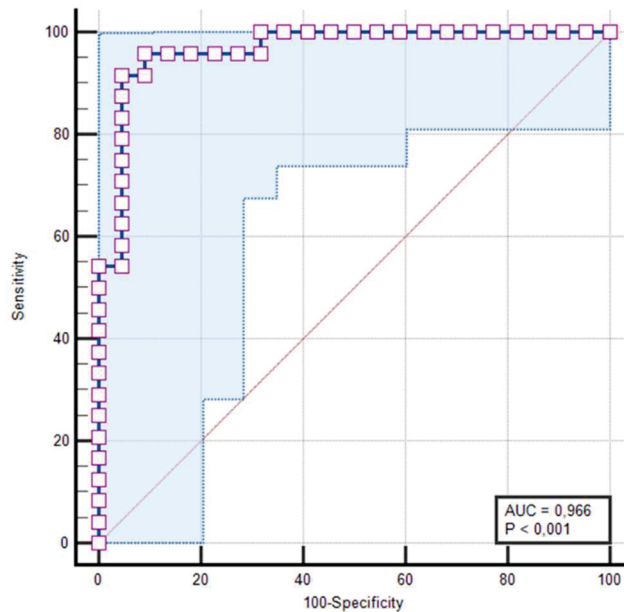
FONTE: A autora (2024).

6.5 CURVA ROC

Após a quantificação dos testes, foi possível calcular a curva ROC. A AUC é de 0,966, com um erro padrão de 0,0248. Este valor indica que o teste tem um desempenho excelente na distinção entre as classes positivas e negativas. A AUC próxima de 1 sugere que o teste possui alta acurácia. O intervalo de confiança de 95%

para a AUC é de 0,866 a 0,997, reforçando a confiabilidade da performance do teste, mostrado no Gráfico 15.

GRÁFICO 15 - CURVA ROC LATERAL FLOW

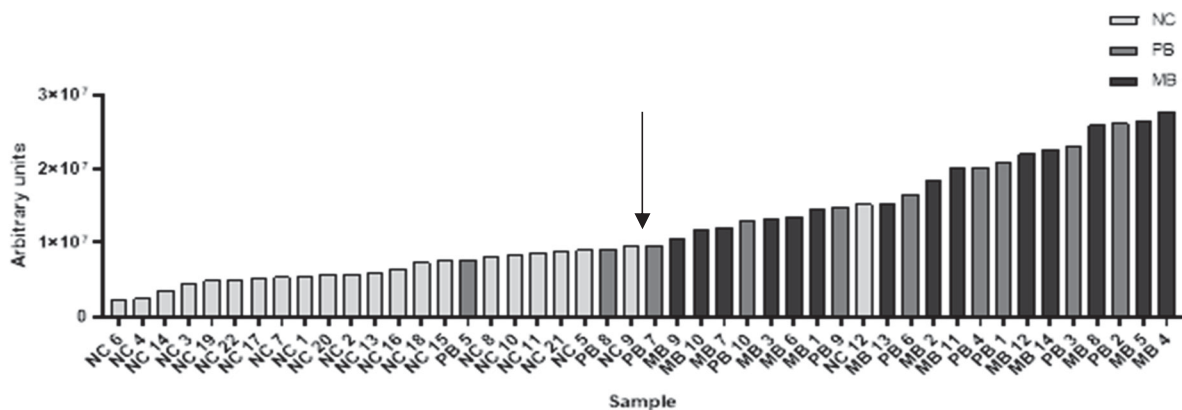


FONTE: A autora (2024).

O índice de Youden (J) é 0,8712. Este índice é calculado como Sensibilidade + Especificidade - 1, e fornece um ponto de corte ótimo para maximizar a eficácia do teste. O *cut-off* do teste foi >9500572, ou seja, valores acima de 9500572 são considerados positivos pelo teste (indicado pela seta) no Gráfico 16.

A sensibilidade do teste foi de 91,67% e a especificidade foi de 95,45%. Estes valores indicam que o teste foi eficaz tanto em detectar a presença da condição quanto em confirmar sua ausência nas amostras testadas.

GRÁFICO 16 - CUT-OFF DO TESTE DE LATERAL FLOW



FONTE: A autora (2024). A seta indica o *cut-off* do teste. Amostras a esquerda da seta foram identificadas pelo teste como negativas e a direita da seta, como positivas para a hanseníase.

7 CONCLUSÕES

Duas metodologias foram utilizadas para o diagnóstico da hanseníase, a primeira baseada em um biossensor eletroquímico e a última, baseada em um imunoensaio cromatográfico, ambas as metodologias utilizaram peptídeos imunorreativos carreados à proteína KLH com a finalidade de otimizar a exposição dos peptídeos e a consequente interação com os anticorpos de pacientes.

Foi desenvolvido um biossensor eletroquímico modificado com nanotubos de carbono para a detecção de anticorpos reagentes com três epítomos imunodominantes de proteínas do *Mycobacterium leprae*, com 50% de sensibilidade e 90% de especificidade na coorte testada, corroborando que o emprego de epítomos imunodominantes é uma boa estratégia para se atingir bons níveis de especificidade.

Embora mais testes sejam necessários, em um teste com especificidade elevada, se houver positividade, maior seria a probabilidade de o paciente ter, efetivamente, entrado em contato com o bacilo. Entretanto, devido à baixa sensibilidade, em caso de negatividade, não seria prudente excluir o diagnóstico. Por isso, um teste como este traria uma informação complementar à suspeita médica embasada na caracterização das manifestações clínicas identificadas.

Em se tratando de uma doença negligenciada e de grande importância em saúde pública, destaca-se a simplicidade e a inovação metodológica, proporcionando uma abordagem de baixo custo com resultados rápidos. Os eletrodos são descartáveis e foram produzidos a um custo de US\$ 0,10/unidade.

Uma limitação do estudo foi a inexistência de um teste sorológico padrão ouro para ser usado como referência ou, ainda, de anticorpos monoclonais produzidos contra os peptídeos para que fosse possível uma estimativa do limite de detecção do ensaio imunoquímico. Portanto, foi necessária a utilização de amostras clinicamente classificadas nessa prova de conceito.

Este estudo pioneiro apresenta a primeira aplicação conhecida de nanotubos de carbono de parede múltipla na modificação de eletrodos para diagnóstico da hanseníase.

No que se refere ao teste imunocromatográfico, apresenta-se como uma ferramenta valiosa no diagnóstico da hanseníase, especialmente devido às suas características de simplicidade, rapidez e custo reduzido, cada tira foi produzida ao custo de US\$ 0,05. Este tipo de imunoensaio cromatográfico utilizou nanopartículas

de ouro decoradas com peptídeos imunorreativos carregados na proteína KLH e imunoglobulina G anti-humana como molécula de captura, proporcionando uma abordagem eficaz para a detecção de anticorpos específicos contra o *Mycobacterium leprae*. O teste foi avaliado em uma coorte de amostras negativas para a doença, provenientes de região não endêmica e amostras positivas, PB e MB classificadas pelo diagnóstico clínico.

O LFIA foi avaliado com resultados promissores, apresentando uma sensibilidade de 91,67% e uma especificidade de 95,45%. A alta sensibilidade implica que o teste é eficaz na identificação de casos positivos, o que é crucial para o diagnóstico precoce e tratamento adequado da hanseníase. Por outro lado, a alta especificidade reduz a probabilidade de falsos positivos, o que é vital para evitar diagnósticos errôneos e o estigma associado à doença.

Dada a importância da hanseníase como uma doença negligenciada, o desenvolvimento de métodos de diagnóstico acessíveis e eficientes é essencial para o controle e eventual erradicação da doença. O LFIA oferece várias vantagens, como rapidez - o teste pode ser realizado em questão de minutos, permitindo uma detecção rápida e ajudando na tomada de decisões clínicas imediata; simplicidade - não requer equipamentos complexos ou técnicos especializados, tornando-o adequado para uso em áreas com recursos limitados e custo-efetividade - a produção do teste é relativamente barata, com estimativas de custos baixos para cada unidade, o que é determinantes para a implementação em larga escala em programas de saúde pública.

Em síntese, esta pesquisa contribui substancialmente para o diagnóstico da hanseníase, unindo avanços em eletro e imunoquímica.

7.1 PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS

Uma linha de investigação futura para a metodologia eletroquímica é o uso de anticorpos de captura anti-IgM. Esta abordagem pode aumentar a sensibilidade do biossensor, especialmente em fases iniciais da infecção por *Mycobacterium leprae*, nas quais a resposta imunológica de IgM é predominante. Implementar anticorpos de captura anti-IgM pode fornecer uma camada adicional de detecção, melhorando a precisão do diagnóstico eletroquímico.

É muito importante desenvolver um teste sorológico padrão ouro e produzir anticorpos monoclonais específicos contra os peptídeos utilizados. Esses padrões e anticorpos forneceriam uma base sólida para calibrar os biossensores e estabelecer parâmetros de sensibilidade e especificidade mais precisos, aumentando a confiabilidade dos diagnósticos.

Outra direção promissora é a criação de proteínas quiméricas com espaçadores mais extensos. Essas proteínas podem melhorar a exposição dos epítomos imunorreativos, facilitando uma interação mais eficaz com os anticorpos dos pacientes. Esta inovação tem o potencial de aumentar tanto a sensibilidade quanto a especificidade dos biossensores eletroquímicos.

Uma área importante para futuros estudos é a avaliação da performance do teste imunocromatográfico (LFIA) utilizando sangue total. Até o momento, os testes foram realizados apenas com soro de pacientes. Testar com sangue total pode simplificar o procedimento de coleta e ser mais adequado para uso em campo, especialmente em áreas com recursos limitados, aumentando a aplicabilidade prática do teste.

Para garantir a especificidade do teste imunocromatográfico, é essencial validar sua eficácia com soros de pacientes que apresentam outras dermatoses. Isso ajudaria a confirmar que o teste não produz falsos positivos devido a reações cruzadas, melhorando a acurácia e a confiabilidade do diagnóstico.

Avaliar a reatividade do teste imunocromatográfico com soros de pacientes infectados por outras micobactérias, como *Mycobacterium tuberculosis*, é fundamental. Esse estudo garantiria que o teste possa diferenciar entre infecções por diferentes micobactérias, reforçando sua especificidade e utilidade clínica.

Similar à metodologia eletroquímica, a implementação de proteínas quiméricas com espaçadores mais extensos pode ser explorada na metodologia imunocromatográfica. Esta inovação pode potencialmente melhorar a sensibilidade e especificidade do teste LFIA, proporcionando uma ferramenta de diagnóstico ainda mais eficaz.

Estas direções futuras não apenas expandirão a aplicabilidade e a precisão das metodologias de diagnóstico da hanseníase, mas também contribuirão significativamente para os esforços globais de controle e eventual erradicação da doença.

8 REFERÊNCIAS

AFONSO, A. S. et al. Simple and rapid fabrication of disposable carbon-based electrochemical cells using an electronic craft cutter for sensor and biosensor applications. **Talanta**, v. 146, p. 381–387, jan. 2016.

AKBARIAN, M. et al. **Bioactive Peptides: Synthesis, Sources, Applications, and Proposed Mechanisms of Action**. **International Journal of Molecular Sciences** MDPI, , 1 fev. 2022.

ALBAN, S. M. et al. Identification of mimotopes of *Mycobacterium leprae* as potential diagnostic reagents. **BMC Infectious Diseases**, v. 13, n. 1, p. 42, 25 dez. 2013.

ALBAN, S. M. et al. Phage Display and Synthetic Peptides as Promising Biotechnological Tools for the Serological Diagnosis of Leprosy. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, p. e106222, 29 ago. 2014.

ARAÚJO, M. G. Hanseníase no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 3, p. 373–382, jun. 2003.

ATTA, N. F.; GALAL, A.; HASSAN, S. H. Comparative Study of Metallocene Modified Gold Nanoparticles Polymer Electrodes for Effective Determination of Dopamine. **Electroanalysis**, v. 32, n. 12, p. 2860–2869, 1 dez. 2020.

AZTATZI-PLUMA, D. et al. Study of the Molecular Interactions between Functionalized Carbon Nanotubes and Chitosan. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 120, n. 4, p. 2371–2378, 4 fev. 2016.

BECHLER, R. G. Re-conhecendo Armauer Hansen: o cientista da lepra eo personagem histórico. **FRONTEIRAS Revista de História**, v. 13, n. 23, p. 59–96, 2011.

BISHOP, J. D. et al. **Sensitivity enhancement in lateral flow assays: A systems perspective. Lab on a Chip**Royal Society of Chemistry, , 7 ago. 2019.

BOMMINEEDI, L. K.; UPADHYAY, N.; MINNES, R. Screen Printing: An Ease Thin Film Technique. Em: **Simple Chemical Methods for Thin Film Deposition**. Singapore: Springer Nature Singapore, 2023. p. 449–507.

BRASIL, M. DA S. **Guia de procedimentos técnicos em baciloscopia em hanseníase**. , 2010a.

BRASIL, M. DA S. **Guia de procedimentos técnicos : baciloscopia em hanseníase**. [s.l: s.n.].

BRASIL, M. DA S. **Guia prático sobre a hanseníase**Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de Vigilância e Doenças Transmissíveis. [s.l: s.n.]. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_pratico_hanseniase.%0Apdf>.

BRASIL, M. DA S. Caracterização da situação epidemiológica da hanseníase e diferenças por sexo, Brasil, 2012-2016. **Boletim epidemiológico**, v. 49, n. 4, p. 1–12, 2018.

BRASIL, M. DA S. **Estratégia Nacional para Enfrentamento da Hanseníase 2019-2022. Estratégia Nacional para Enfrentamento da Hanseníase 2019-2022**Brasília - DF Editora MS, , 2020a. Disponível em: <www.saude.gov.br/bvs>

BRASIL, M. DA S. **Boletim Epidemiológico Hanseníase 2020**Boletim Epidemiológico de Hanseníase. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2020/janeiro/31/Boletim-hanseniase-2020-web.pdf>>.

BRASIL, M. DA S. **PROTOCOLO CLÍNICO E DIRETRIZES TERAPÊUTICAS DA HANSENÍASE**. , 2022a.

BRASIL, M. DA S. **Portaria Nº 189, de 9 de junho de 2022.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/portaria-n-189-de-9-de-junho-de-2022-411025814>>.

BRASIL, M. DA S. **Hanseníase 2024.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br>>.

BRETT, S. J. et al. Serological activity of a characteristic phenolic glycolipid from *Mycobacterium leprae* in sera from patients with leprosy and tuberculosis. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 52, n. 2, p. 271, maio 1983.

BRITTON, W. J.; LOCKWOOD, D. N. Leprosy. **The Lancet**, v. 363, n. 9416, p. 1209–1219, abr. 2004.

BÜHRER-SÉKULA, S. et al. Simple and fast lateral flow test for classification of leprosy patients and identification of contacts with high risk of developing leprosy. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 5, p. 1991–1995, 1 maio 2003.

BURCU BAHADIR, E.; KEMAL SEZGINTÜRK, M. Applications of electrochemical immunosensors for early clinical diagnostics. **Talanta**, v. 132, p. 162–174, 15 jan. 2015.

CALIFF, R. M. Biomarker definitions and their applications. **Experimental Biology and Medicine**, v. 243, n. 3, p. 213–221, 6 fev. 2018.

CASTRO, K. R. et al. Electrochemical magneto-immunoassay for detection of zika virus antibody in human serum. **Talanta**, v. 256, 1 maio 2023.

CHEN, J. H. et al. Removal of U(VI) from aqueous solutions by using MWCNTs and chitosan modified MWCNTs. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 295, n. 3, p. 2233–2241, 4 mar. 2013.

CLAPASSON, A.; CANATA, S. Microbiology. Em: NUNZI, E.; MASSONE, C. (Eds.). **Leprosy: A Practical Guide**. 1. ed. Milano: Springer Milan, 2012. v. 1p. 15–18.

COGEN, A. L. et al. Human Beta-Defensin 3 Is Up-Regulated in Cutaneous Leprosy Type 1 Reactions. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 11, nov. 2012.

CONTENT, J. et al. Nucleotide sequence of the gene coding for the 85-B antigen of *Mycobacterium leprae*. **Nucleic Acids Research**, v. 19, n. 20, p. 5789–5789, 25 out. 1991.

CORDEIRO, T. A. R. et al. Impedimetric immunosensor for rapid and simultaneous detection of chagas and visceral leishmaniasis for point of care diagnosis. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 169, p. 112573, 1 dez. 2020.

CORSTJENS, P. L. A. M. et al. A user-friendly, highly sensitive assay to detect the IFN- γ secretion by T cells. **Clinical Biochemistry**, v. 41, n. 6, p. 440–444, 1 abr. 2008.

CRAPNELL, R. D. et al. Electroanalytical overview: screen-printed electrochemical sensing platforms for the detection of vital cardiac, cancer and inflammatory biomarkers. **Sensors & Diagnostics**, v. 1, n. 3, p. 405–428, 19 maio 2022.

DE OLIVEIRA, P. R. et al. Use of beeswax as an alternative binder in the development of composite electrodes: an approach for determination of hydrogen peroxide in honey samples. **Electrochimica Acta**, v. 390, p. 138876, 10 set. 2021.

DE SANTANA, J. F. et al. Engineered biomarkers for leprosy diagnosis using labeled and label-free analysis. **Talanta**, v. 187, n. May, p. 165–171, 1 set. 2018.

DE SOUSA, J. R.; SOTTO, M. N.; SIMÕES QUARESMA, J. A. Leprosy As a Complex Infection: Breakdown of the Th1 and Th2 Immune Paradigm in the

Immunopathogenesis of the Disease. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. NOV, p. 18–21, 28 nov. 2017.

DI NARDO, F. et al. Ten Years of Lateral Flow Immunoassay Technique Applications: Trends, Challenges and Future Perspectives. **Sensors 2021, Vol. 21, Page 5185**, v. 21, n. 15, p. 5185, 30 jul. 2021a.

DI NARDO, F. et al. Ten Years of Lateral Flow Immunoassay Technique Applications: Trends, Challenges and Future Perspectives. **Sensors 2021, Vol. 21, Page 5185**, v. 21, n. 15, p. 5185, 30 jul. 2021b.

DILEO, R. A.; LANDI, B. J.; RAFFAELLE, R. P. Purity assessment of multiwalled carbon nanotubes by Raman spectroscopy. **Journal of Applied Physics**, v. 101, n. 6, p. 64307, 15 mar. 2007.

DUBEY, R. et al. **Functionalized carbon nanotubes: synthesis, properties and applications in water purification, drug delivery, and material and biomedical sciences. Nanoscale Advances** Royal Society of Chemistry, , 21 out. 2021.

DUPNIK, K. Leprosy (*Mycobacterium leprae*). Em: BENNETT, J. E.; DOLIN, R.; BLASER, M. J. (Eds.). **Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases**. 9 Edition ed. [s.l.] Elsevier, 2020. p. 3875–3889.

DUTHIE, M. S. et al. Rapid quantitative serological test for detection of infection with *Mycobacterium leprae*, the causative agent of leprosy. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 2, p. 613–619, fev. 2014.

ELGRISHI, N. et al. A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry. **Journal of Chemical Education**, v. 95, n. 2, p. 197–206, 13 fev. 2018.

EVANS, A. S. et al. Causation and Disease: The Henle-Koch Postulates Revisited. **The Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 49, n. 2, p. 175, maio 1976a.

EVANS, A. S. et al. Causation and Disease: The Henle-Koch Postulates Revisited. **The Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 49, n. 2, p. 175, maio 1976b.

FINE, P. E. M. et al. Comparability Among Histopathologists in the Diagnosis and Classification of Lesions Suspected of Leprosy in Malawi'. **INTERNATIONAL JOURNAL OF LEPROSY**, v. 54, n. 4, p. 614–625, 1986.

FORBES, J.; KRISHNAMURTHY, K. Biochemistry, Peptide. **StatPearls**, 28 ago. 2023.

GAO, J. et al. Effective dispersion of oxidized multi-walled carbon nanotubes using a water-soluble N,O-carboxymethyl chitosan via non-covalent interaction. **RSC Advances**, v. 12, n. 36, p. 23754–23761, 16 ago. 2022a.

GAO, J. et al. Effective dispersion of oxidized multi-walled carbon nanotubes using a water-soluble *N*, *O* -carboxymethyl chitosan *via* non-covalent interaction. **RSC Advances**, v. 12, n. 36, p. 23754–23761, 16 ago. 2022b.

GAO, S. et al. Significance of the antibody orientation for the lateral flow immunoassays: A mini-review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 257, p. 128621, 1 fev. 2024.

GASCHIGNARD, J. et al. Pauci- and Multibacillary Leprosy: Two Distinct, Genetically Neglected Diseases. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 5, p. e0004345, 24 maio 2016.

GAUTAM, S. et al. Insights into Mycobacterium leprae Proteomics and Biomarkers—An Overview. **Proteomes**, v. 9, n. 1, p. 1–18, 1 mar. 2021.

GEORGE, A. et al. Label-Free Detection of Chikungunya Non-Structural Protein 3 Using Electrochemical Impedance Spectroscopy. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 166, n. 14, p. B1356–B1363, 14 out. 2019.

GILLIS, T. P. Mycobacterium leprae. Em: **Molecular Medical Microbiology**. [s.l.] Elsevier, 2015. p. 1655–1668.

GOLDSTEIN, J. I. et al. Coating and Conductivity Techniques for SEM and Microanalysis. **Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis**, p. 671–740, 1992.

GOULART, I. M. B.; PENNA, G. O.; CUNHA, G. Imunopatologia da hanseníase: a complexidade dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro ao Mycobacterium leprae. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 4, p. 363–375, ago. 2002.

GROUP, F.-N. B. W. Contents of a Biomarker Description. 28 dez. 2020.

GRYS, D. B. et al. Citrate Coordination and Bridging of Gold Nanoparticles: The Role of Gold Adatoms in AuNP Aging. **ACS Nano**, v. 14, n. 7, p. 8689–8696, 28 jul. 2020.

GRZYBOWSKI, A. et al. Gerhard Henrik Armauer Hansen (1841-1912)—The 100th anniversary of the death of the discoverer of Mycobacterium leprae. **Clinics in Dermatology**, v. 31, n. 5, p. 653–655, set. 2013.

GRZYBOWSKI, A.; KLUXEN, G.; PÓŁTORAK, K. Gerhard Henrik Armauer Hansen (1841-1912) - 100 years anniversary tribute. **Acta Ophthalmologica**, v. 92, n. 3, p. 296–300, maio 2014.

GUO, J. et al. Nanomaterial Labels in Lateral Flow Immunoassays for Point-of-Care-Testing. **Journal of Materials Science & Technology**, v. 60, p. 90–104, 10 jan. 2021.

GURUNG, P. et al. Diagnostic accuracy of tests for leprosy: a systematic review and meta-analysis. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 25, n. 11, p. 1315–1327, 1 nov. 2019.

HAN, X. Y. et al. A New *Mycobacterium* Species Causing Diffuse Lepromatous Leprosy. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 130, n. 6, p. 856–864, 1 dez. 2008.

HARBOE, M. Armauer Hansen- The Man and His Work 1. v. 41, n. 4, p. 417–424, 1973.

HASSANPOUR, S.; HASANZADEH, M. Label-free electrochemical-immunoassay of cancer biomarkers: Recent progress and challenges in the efficient diagnosis of cancer employing electroanalysis and based on point of care (POC). **Microchemical Journal**, v. 168, p. 106424, 1 set. 2021.

HOU, W.; ZHANG, X.; LIU, C. F. **Progress in Chemical Synthesis of Peptides and Proteins. Transactions of Tianjin University** Tianjin University, , 1 set. 2017.

IRGENS, L. M. The Discoverer of the Leprosy Bacillus. **Tidsskr Nor Lægeforen**, v. 122, n. 7, p. 708–709, 24 ago. 2002.

JAIN, S. et al. High-Resolution Sonography: A New Technique to Detect Nerve Damage in Leprosy. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 8, p. e498, 11 ago. 2009.

JANECZEK, K. et al. Assessment of electromechanical properties of screen printed polymer nanopastes. **Materials Science and Engineering: B**, v. 178, n. 8, p. 511–519, 1 maio 2013.

JANS, H. et al. Dynamic light scattering as a powerful tool for gold nanoparticle bioconjugation and biomolecular binding studies. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 22, p. 9425–9432, 2009.

JOB, C. K.; SANCHEZ, R. M.; HASTINGS, R. C. Manifestations of experimental leprosy in the armadillo. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 34, n. 1, p. 151–161, 1 jan. 1985.

JOHANSEN, K.; LUNDSTRÖM, I.; LIEBERG, B. Sensitivity deviation: instrumental linearity errors that influence concentration analyses and kinetic evaluation of biomolecular interactions. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 15, n. 9–10, p. 503–509, 1 nov. 2000.

JOHN TURKEVICH, B.; COOPER STEVENSON, P.; HILLIER, J. **A STUDY OF THE NUCLEATION AND GROWTH PROCESSES I N THE SYNTHESIS OF COLLOIDAL GOLD** *Anal. Chem.* [s.l.] Turkevich and Hillier, 1941.

JUSTINO, C. I. L.; DUARTE, A. C.; ROCHA-SANTOS, T. A. P. Immunosensors in Clinical Laboratory Diagnostics. **Advances in Clinical Chemistry**, v. 73, p. 65–108, 1 jan. 2016.

KA, M. B. et al. Phenotypic Diversity and Emerging New Tools to Study Macrophage Activation in Bacterial Infectious Diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. OCT, 10 out. 2014.

KADARA, R. O.; JENKINSON, N.; BANKS, C. E. Characterisation of commercially available electrochemical sensing platforms. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 138, n. 2, p. 556–562, 6 maio 2009.

KANT, T. et al. Inkjet-printed paper-based electrochemical sensor with gold nano-ink for detection of glucose in blood serum. **New Journal of Chemistry**, v. 45, n. 18, p. 8297–8305, 2021.

KETTLER, H.; WHITE, K.; HAWKES, S. Mapping the landscape of diagnostics for sexually transmitted infections: Key findings and recommendations. **Unicef/Undp/World Bank/Who**, p. 1–44, 2004.

KOBRO, I. Gerhard Henrik Armauer Hansen (1841-1912). **Annals of medical history**, v. 7, n. 2, p. 127–132, 1925.

KOKKINOS, C.; ECONOMOU, A.; GIOKAS, D. Paper-based device with a sputtered tin-film electrode for the voltammetric determination of Cd(II) and Zn(II). **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 260, p. 223–226, 1 maio 2018.

KRUTZIK, S. R. et al. Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. **Nature Medicine** 2003 9:5, v. 9, n. 5, p. 525–532, 14 abr. 2003.

KUMAR, N. et al. Comprehensive electrophysiology in leprous neuropathy - Is there a clinico-electrophysiological dissociation? **Clinical Neurophysiology**, v. 127, n. 8, p. 2747–2755, 1 ago. 2016.

LEGENDRE, D. P.; MUZNY, C. A.; SWIATLO, E. Hansen's Disease (Leprosy): Current and Future Pharmacotherapy and Treatment of Disease-Related Immunologic Reactions. **Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy**, v. 32, n. 1, p. 27–37, jan. 2012.

LEHMAN, L. F. et al. **AVALIAÇÃO NEUROLÓGICA SIMPLIFICADA**. [s.l: s.n.].

LI, W. et al. The 9-Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) group in chemical peptide synthesis-its past, present, and future. **Australian Journal of Chemistry**CSIRO, , 1 abr. 2020.

LI, Y. et al. Peptide-mediated synthesis of gold nanoparticles: effects of peptide sequence and nature of binding on physicochemical properties. **Nanoscale**, v. 6, n. 6, p. 3165–3172, 27 fev. 2014.

LIBERATO, M. S. et al. Peptide-Based Assemblies on Electrospun Polyamide-6/Chitosan Nanofibers for Detecting Visceral Leishmaniasis Antibodies. **ACS Applied Electronic Materials**, v. 1, n. 10, p. 2086–2095, 22 out. 2019.

LIU, Y. et al. A novel electrochemical immunosensor based on AuNPs/PNR/CS@MWCNTs-COOH for rapid detecting warning markers-BNP of heart failure caused by myocardial infarction. **Microchemical Journal**, v. 207, p. 111654, 1 dez. 2024.

MAJERIČ, P. et al. Physicochemical Properties of Gold Nanoparticles for Skin Care Creams. **Materials** **2023**, Vol. **16**, Page **3011**, v. 16, n. 8, p. 3011, 11 abr. 2023.

MARTINEZ, A. N. et al. PCR-Based Techniques for Leprosy Diagnosis: From the Laboratory to the Clinic. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 4, 2014.

MARTINS, B. R. et al. Development of an Electrochemical Immunosensor for Specific Detection of Visceral Leishmaniasis Using Gold-Modified Screen-Printed Carbon Electrodes. **Biosensors** **2020**, Vol. **10**, Page **81**, v. 10, n. 8, p. 81, 23 jul. 2020.

MATOS, V. M. J.; SANTOS, A. L. Leprogenic odontodysplasia: new evidence from the St. Jørgen's medieval leprosarium cemetery (Odense, Denmark). **Anthropological Science**, v. 121, n. 1, p. 43–47, 2013.

MERRIFIELD, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. **Journal of the American Chemical Society**, v. 85, n. 14, p. 2149–2154, 1 jul. 1963.

MODLIN, R. L. The innate immune response in leprosy. **Current Opinion in Immunology**, v. 22, n. 1, p. 48–54, fev. 2010.

MONOT, M. et al. On the origin of leprosy. **Science**, v. 308, n. S1, p. 1040–1042, 13 maio 2005.

MONOT, M. et al. Comparative genomic and phylogeographic analysis of *Mycobacterium leprae*. **Nature Genetics**, v. 41, n. 12, p. 1282–1289, dez. 2009.

MORAES, M. O. et al. Genetics of host response in leprosy. **Lepr Rev**, p. 189–202, 10 maio 2006.

MOURA, M. L. N. et al. Active Surveillance of Hansen's Disease (Leprosy): Importance for Case Finding among Extra-domiciliary Contacts. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 3, p. e2093, 2013.

NASRIN, F. et al. Fluorescent and electrochemical dual-mode detection of Chikungunya virus E1 protein using fluorophore-embedded and redox probe-encapsulated liposomes. **Microchimica Acta**, v. 187, n. 12, p. 1–11, 1 dez. 2020.

NG, V. et al. Role of the cell wall phenolic glycolipid-1 in the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*. **Cell**, v. 103, n. 3, p. 511–524, 27 out. 2000.

NIU, X. et al. Review—Nanozyme-Based Immunosensors and Immunoassays: Recent Developments and Future Trends. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 167, n. 3, p. 037508, 20 nov. 2020.

OTERO, E. et al. Substituent effects in the iron 2p and carbon 1s edge Near-Edge X-ray Absorption Fine Structure (NEXAFS) spectroscopy of ferrocene compounds. **Journal of Physical Chemistry A**, v. 112, n. 4, p. 624–634, 31 jan. 2008.

PALOMAR, Q. et al. Voltammetric sensing of recombinant viral dengue virus 2 NS1 based on Au nanoparticle–decorated multiwalled carbon nanotube composites. **Microchimica Acta**, v. 187, n. 6, p. 1–10, 1 jun. 2020.

PANDEY, S.; MALVIYA, G.; CHOTTOVA DVORAKOVA, M. Role of Peptides in Diagnostics. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 16, 2 ago. 2021.

PANDYA, S. S. The First International Leprosy Conference, Berlin, 1897: the politics of segregation. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, v. 10, n. suppl 1, p. 161–177, 2003.

PARKASH, O. et al. Performance of recombinant ESAT-6 antigen (ML0049) for detection of leprosy patients. **Letters in Applied Microbiology**, v. 44, n. 5, p. 524–530, 1 maio 2007.

PATIL, G. C. Doctor Blade: A Promising Technique for Thin Film Coating. Em: **Simple Chemical Methods for Thin Film Deposition**. Singapore: Springer Nature Singapore, 2023. p. 509–530.

PENNA, M. L. F. et al. Anti-PGL-1 Positivity as a Risk Marker for the Development of Leprosy among Contacts of Leprosy Cases: Systematic Review and Meta-analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 5, 2016.

PIRO, B.; REISBERG, S. Recent Advances in Electrochemical Immunosensors. **Sensors**, v. 17, n. 4, p. 794, 7 abr. 2017.

PLOEMACHER, T. et al. Reservoirs and transmission routes of leprosy; A systematic review. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 4, p. e0008276, 1 abr. 2020.

RAPP, B. E.; GRUHL, F. J.; LÄNGE, K. Biosensors with label-free detection designed for diagnostic applications. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 398, n. 6, p. 2403–2412, 19 nov. 2010.

RAZO, S. C. et al. Comparative study of four coloured nanoparticle labels in lateral flow immunoassay. **Nanomaterials**, v. 11, n. 12, p. 3277, 1 dez. 2021.

REIBEL, F.; CAMBAU, E.; AUBRY, A. Update on the epidemiology, diagnosis, and treatment of leprosy. **Medecine et Maladies Infectieuses**, v. 45, n. 9, p. 383–393, 2015.

RIDLEY, D. S.; JOPLING, W. H. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. **International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association**, v. 34, n. 3, p. 255–73, 1966.

ROBBINS, G. et al. Ancient Skeletal Evidence for Leprosy in India (2000 B.C.). **PLOS ONE**, v. 4, n. 5, p. e5669, 27 maio 2009.

ROBERTSON, J. The Leprosy Asylum in India: 1886-1947. **Journal of the History of Medicine and Allied Sciences**, v. 64, n. 4, p. 474–517, 1 out. 2009.

RUIZ, G. et al. pH Impacts the Orientation of Antibody Adsorbed onto Gold Nanoparticles. **Bioconjugate Chemistry**, v. 30, n. 4, p. 1182–1191, 17 abr. 2019.

SAHOO, N. G. et al. Polymer nanocomposites based on functionalized carbon nanotubes. **Progress in Polymer Science**, v. 35, n. 7, p. 837–867, 1 jul. 2010.

SANTOS, A. R. et al. **Detection of Mycobacterium leprae DNA by Polymerase Chain Reaction in the Blood of Individuals, Eight Years after Completion of Anti-leprosy Therapy** Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. [s.l: s.n.].

SANTOS, C. DA C. et al. A new tool for dengue virus diagnosis: Optimization and detection of anti-NS1 antibodies in serum samples by impedimetric transducers. **Microchemical Journal**, v. 154, p. 104544, 1 maio 2020.

SANTOS, K. C. B. DOS et al. Estratégias de controle e vigilância de contatos de hanseníase: revisão integrativa. **Saúde em Debate**, v. 43, n. 121, p. 576–591, 5 ago. 2019.

SCHOREY, J. S. et al. A Mycobacterium leprae gene encoding a fibronectin binding protein is used for efficient invasion of epithelial cells and Schwann cells. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 7, p. 2652–2657, 1995.

SCOLLARD, D. M. et al. The Continuing Challenges of Leprosy. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 2, p. 338–381, abr. 2006.

SHANG, Y. et al. Immobilization of a HER2 Mimotope-derived Synthetic Peptide on Au and Its Potential Application for Detection of Herceptin in Human Serum by QCM. **Analytical chemistry**, v. 83, n. 23, p. 8928, 12 dez. 2011.

SHAO, D. et al. Polyaniline multiwalled carbon nanotube magnetic composite prepared by plasma-induced graft technique and its application for removal of aniline and phenol. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 114, n. 49, p. 21524–21530, 16 dez. 2010.

SHARMA, M. K. et al. A novel piezoelectric immunosensor for the detection of malarial Plasmodium falciparum histidine rich protein-2 antigen. **Talanta**, v. 85, n. 4, p. 1812–1817, 30 set. 2011.

SHEPARD, C. C. THE EXPERIMENTAL DISEASE THAT FOLLOWS THE INJECTION OF HUMAN LEPROSY BACILLI INTO FOOT-PADS OF MICE. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 112, n. 3, p. 445, 9 set. 1960.

SIL, A.; DAS, A. History of leprosy in India: An overview of historic and modern contributions. **Clinics in Dermatology**, v. 40, n. 6, p. 691–699, 1 nov. 2022.

SINGH, A. V. et al. Intact Mycobacterium leprae Isolated from Placenta of a Pregnant Woman, China. **Emerging Infectious Diseases**, v. 26, n. 8, p. 1961, 1 ago. 2020.

SINGH, P. et al. Insight into the evolution and origin of leprosy bacilli from the genome sequence of *Mycobacterium lepromatosis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 14, p. 4459–4464, 7 abr. 2015.

SOARES, B. A. et al. Epitope mapping from Mycobacterium leprae proteins: Convergent data from in silico and in vitro approaches for serodiagnosis of leprosy. **Molecular Immunology**, v. 138, n. July, p. 48–57, out. 2021.

SPENCER, J. S. et al. Analysis of antibody responses to Mycobacterium leprae phenolic glycolipid I, lipoarabinomannan, and recombinant proteins to define disease subtype-specific antigenic profiles in leprosy. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 18, n. 2, p. 260–267, fev. 2011.

SPENCER, J. S. et al. Identification of serological biomarkers of infection, disease progression and treatment efficacy for leprosy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. suppl 1, p. 79–89, dez. 2012.

SPENCER, J. S.; BRENNAN, P. J. The Role of Mycobacterium leprae Phenolic Glycolipid I (PGL-I) in Serodiagnosis and in the Pathogenesis of Leprosy. **Leprosy Review**, v. 82, n. 4, p. 344–357, 1 dez. 2011.

STEFANI, M. M. et al. Potential plasma markers of type 1 and type 2 leprosy reactions: A preliminary report. **BMC Infectious Diseases**, v. 9, n. 1, p. 1–8, 27 maio 2009.

TSENG, W. S.; TSENG, C. Y.; KUO, C. T. Effects of gas composition on highly efficient surface modification of multi-walled carbon nanotubes by cation treatment. **Nanoscale Research Letters**, v. 4, n. 3, p. 234–239, 16 mar. 2009.

ULE BELOTTI, N. et al. Laboratory diagnosis of leprosy: Two staining methods from bacilloscopy and rapid ml flow test. **International Journal of Mycobacteriology**, v. 10, n. 4, p. 393–397, 1 out. 2021.

URA, S.; BARRETO, J. A. Papel da biópsia cutânea no diagnóstico de hanseníase. **Hansenologia Internationalis: hanseníase e outras doenças infecciosas**, v. 29, n. 2, p. 141–144, 30 nov. 2004.

VAN DIJK, J. H. M. et al. Synthetic Phenolic Glycolipids for Application in Diagnostic Tests for Leprosy. **ChemBioChem**, v. 22, n. 8, p. 1487–1493, 16 abr. 2021.

VAN HOOIJ, A. et al. Quantitative lateral flow strip assays as User-Friendly Tools To Detect Biomarker Profiles For Leprosy. **Scientific Reports 2016 6:1**, v. 6, n. 1, p. 1–10, 29 set. 2016a.

VAN HOOIJ, A. et al. Quantitative lateral flow strip assays as User-Friendly Tools To Detect Biomarker Profiles For Leprosy. **Scientific Reports 2016 6:1**, v. 6, n. 1, p. 1–10, 29 set. 2016b.

VAN HOOIJ, A.; GELUK, A. In search of biomarkers for leprosy by unraveling the host immune response to Mycobacterium leprae. **Immunological Reviews**, v. 301, n. 1, p. 175–192, 1 maio 2021.

VIJAYAN, J.; WILDER-SMITH, E. P. Neurological Manifestations of Leprosy. **International textbook of leprosy**, p. 1–20, 2018.

VIJAYARAGHAVAN, R. Nine-banded Armadillo *Dasypus novemcinctus* Animal Model for Leprosy (Hansen's Disease). **Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science**, v. 36, n. 2, p. 167–176, 1 dez. 2009.

VIRMOND, M.; GRZYBOWSKI, A.; VIRMOND, L. Leprosy: A glossary. **Clinics in Dermatology**, v. 33, n. 1, p. 8–18, jan. 2015.

WALKER, S. L.; LOCKWOOD, D. N. J. The clinical and immunological features of leprosy. **British Medical Bulletin**, v. 77–78, n. 1, p. 103–121, 1 jan. 2006.

WANG, S. F. et al. Preparation and mechanical properties of chitosan/carbon nanotubes composites. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 6, p. 3067–3072, nov. 2005.

WELCH, N. G. et al. Orientation and characterization of immobilized antibodies for improved immunoassays (Review). **Biointerphases**, v. 12, n. 2, p. 2–301, 1 jun. 2017.

WEN, W. et al. **Recent Advances in Electrochemical Immunosensors. Analytical Chemistry** American Chemical Society, , 3 jan. 2017.

WHITE, C.; FRANCO-PAREDES, C. Leprosy in the 21st Century. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 1, p. 80–94, 7 jan. 2015.

WHO, W. H. O. Global Leprosy Strategy 2016–2020. Accelerating towards a leprosy-free world - PAHO/WHO | Pan American Health Organization. **Global Leprosy Strategy 2016-2020**, p. 1–34, 2016.

WHO, W. H. O. Global leprosy (Hansen disease) update, 2019: time to step-up prevention initiatives. **Weekly epidemiological record**, v. 95, n. 36, p. 417–440, 2020.