



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE  
FACULDADE DE MEDICINA**



**DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO FUNCIONALIZADO  
COM RODAMINA 6G PARA DETECÇÃO DE MICOBACTÉRIAS**

**FABIANE NUNES RIELLO**

**UBERLÂNDIA  
2019**

**FABIANE NUNES RIELLO**

**DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO FUNCIONALIZADO  
COM RODAMINA 6G PARA DETECÇÃO DE MICOBACTÉRIAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

**Orientador: Dr. Luiz Ricardo Goulart**

**Coorientadora: Dr<sup>a</sup>. Isabela Maria Bernardes  
Goulart**

**UBERLÂNDIA  
2019**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

R555d Riello, Fabiane Nunes, 1990  
2019 Desenvolvimento de biossensor eletroquímico funcionalizado com rodamina 6G para detecção de micobactérias [recurso eletrônico] / Fabiane Nunes Riello. - 2019.

Orientador: Luiz Ricardo Goulart Filho.

Coorientadora: Isabela Maria Bernardes Goulart.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2019.1239>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Ciências médicas. 2. Eletrodos. 3. Doenças - Diagnóstico. 4. Eletroquímica. I. Goulart Filho, Luiz Ricardo, 1962, (Orient.). II. Goulart, Isabela Maria Bernardes, 1959, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. IV. Título.

---

CDU: 61

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947

## DEDICATÓRIA

*Dedico esse trabalho aos meus queridos e amados pais Creonice e Edoardo que nunca mediram esforços para que eu chegasse até aqui, sempre me apoiando e incentivando.*

*E aos meus avós 'nona' Elvia e 'nono' Lourenço Riello que se foram durante minha caminhada no doutorado deixando saudade, mas a certeza que lá de cima estão orgulhosos pela neta que eles criaram com tanto amor.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus por iluminar os meus caminhos, por me dar saúde, sabedoria e coragem para correr atrás de todos os meus sonhos.

Agradeço imensamente todo amor e cuidado dos meus pais, a criação e educação que sempre lutaram para me dar e todo apoio, que mesmo longe, estão sempre presentes. À toda minha família tios, primos, avós, em especial meu pequeno anjinho, meu afilhado João Miguel que me faz ser uma pessoa melhor a cada dia para ser exemplo na sua vida. E ao meu noivo que tem me amparado nos momentos mais difíceis fazendo de tudo para me fazer feliz.

Sou muito grata aos meus orientadores que já me acompanham há mais de 6 anos e me orientaram durante todo mestrado e doutorado, Dr. Luiz Ricardo Goulart, por ser um exemplo de pesquisador e pessoa, um visionário sempre me norteou e incentivou a pensar grande. E Dra. Isabela Maria Bernardes Goulart por ter acreditado em mim e me dado a oportunidade de contribuir um pouco com o trabalho tão importante e nobre que realiza com os pacientes da hanseníase e por seu profissionalismo admirável, dedicação e amor pelo que faz.

Também à professora Dra. Renata Balvedi que me guiou nas primeiras etapas. E a Dra. Mayara Ingrid por fornecer materiais importantes para o desenvolvimento das pesquisas.

Quero agradecer às amigas Aline, Maria Julia pela amizade, conselhos e boas conversas, Ana Flávia que além de amiga se tornou minha parceira de experimentos, com quem pude contar durante todo o doutorado, sempre com novas ideias, juntas conseguimos encontrar soluções para os problemas enfrentados. À minha irmã de coração Camila por estar do meu lado nos melhores momentos e por muitas vezes segurar minha mão nas dificuldades. E ao amigo Douglas que se dispôs a me ajudar abdicando muitas vezes do seu tempo de descanso.

Agradeço também às técnicas e os funcionários do laboratório que sempre garantiram todo suporte no dia a dia e a toda equipe do Centro Nacional de Referência em Dermatologia Sanitária e Hanseníase (CREDESH) que trabalham com competência na atenção aos pacientes com hanseníase além de nos auxiliarem com as pesquisas.

Finalizo agradecendo a todos os pacientes que contribuem com as pesquisas mesmo em meio a tantas dificuldades.

*“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis. ”*

*José de Alencar*

## Resumo

Métodos que envolvem a detecção eletroquímica têm mostrado novas possibilidades para o diagnóstico de várias doenças. Porém apresentam algumas limitações. Buscando novos meios de funcionalização da superfície dos eletrodos comerciais descartáveis para aderência e reconhecimento de biomoléculas de forma eficiente e com menor custo, utilizou-se a rodamina 6G para funcionalizar eletrodos *screen-printed* de grafite. Amostras de micobactérias foram utilizadas como modelo experimental devido à procura por novas técnicas de diagnóstico mais sensíveis para doenças infecciosas. O anticorpo específico para cada micobactéria foi imobilizado na superfície dos eletrodos funcionalizados e amostras de cultura de tuberculose (TB) e raspado de contatos e pacientes com hanseníase foram detectadas através de leituras em voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial em potenciostato portátil. Eletrodos funcionalizados com rodamina 6G estabilizaram a área de trabalho dos eletrodos funcionalizando-os para maior aderência de biomoléculas. Todas as amostras de cultura de tuberculose foram detectadas e diferenciadas de outras espécies de micobactérias (exceto *M. avium*). O teste com biossensores eletroquímicos para detecção de *M. leprae* demonstrou ser mais sensível com 88,4% de sensibilidade para as amostras de raspado dérmico testadas do que o ELISA (74,4%) e a PCR em tempo real (qPCR) (72,1%), técnicas laboratoriais usadas atualmente para auxiliar no diagnóstico da hanseníase. O biossensor desenvolvido possui vantagens como baixo custo, simplicidade na preparação e imobilização, portabilidade, especificidade, sensibilidade, reprodutibilidade, estabilidade, resposta rápida e tem grande potencial para ser utilizado na detecção, reconhecimento e diagnóstico de biomoléculas que possuam carboidratos na sua estrutura. Importante enfatizar que a plataforma desenvolvida mostrou-se inovadora e pioneira para detecção de bacilos de *M. leprae* podendo ser incorporada com outras técnicas de diagnóstico para identificar contatos assintomáticos auxiliando na detecção e tratamento precoce da hanseníase.

**Palavras-chave:** Eletroquímica. Biossensores. Micobactérias. Hanseníase. Tuberculose. Rodamina.

## ABSTRACT

Methods involving electrochemical detection have shown new possibilities for the diagnosis of various diseases. But they have some limitations. In order to find new ways of modifying the surface of disposable commercial electrodes for adhesion and recognition of biomolecules efficiently and at a lower cost, rhodamine 6G was used for the functionalization of screen-printed graphite electrodes. Mycobacterial samples were used as an experimental model due to the search for new diagnostic techniques more sensitive to infectious diseases. The specific antibody for each mycobacteria was immobilized on the surface of the modified electrodes and samples of tuberculosis culture and Slit-skin smear of contacts and leprosy patients were detected by readings in cyclic voltammetry and voltammetry differential pulse in portable potentiostat. Electrodes modified with rhodamine 6G stabilized the work area of the electrodes and functionalized them for greater adherence of biomolecules. All tuberculosis culture samples were detected and differentiated from other mycobacterial species (except *M. avium*). The electrochemical biosensor test for *M. leprae* was shown to be more sensitive with 88,4% sensitivity for the tested Slit-skin smear samples than ELISA (74.4%) and PCR real time (qPCR) (72.1%), laboratory techniques currently used to assist in the diagnosis of Leprosy. The developed biosensor has advantages such as low cost, simplicity in preparation and immobilization, portability, specificity, sensitivity, reproducibility, stability, rapid response and has great potential to be used in the detection, recognition and diagnosis of biomolecules that have carbohydrates in their structure. It is important to emphasize that the developed platform was innovative and pioneer for the detection of *M. leprae* bacilli and could be incorporated with other diagnostic techniques to identify asymptomatic contacts assisting in the detection and early treatment of leprosy.

**Key words:** Electrochemistry. Biosensors. Mycobacteria. Leprosy. Tuberculosis. Rhodamine.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

**Ac.** - Acurácia  
**AIDS** - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida  
**Ag** - Prata  
**BAAR** - Bacilo álcool ácido resistente  
**BB** - Borderline-borderline  
**BL** - Borderline - lepromatoso  
**BT** - Borderline-tuberculóide  
**CE** - Contra eletrodo  
**CREDESH** - Centro Nacional de Referência em Dermatologia Sanitária e Hanseníase  
**CMTB** - **Complexo** *Mycobacterium tuberculosis*  
**ELISA** - Ensaio imunoabsorção enzimática  
**ER** - Eletrodo de referência  
**Esp.** - Especificidade  
**ET** - Eletrodo de trabalho  
**EQM** - Eletrodo quimicamente modificado  
**HC** - Hospital de Clínicas  
**HIV** - Vírus da imunodeficiência humana  
**IE** - Índice ELISA  
**K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>** - Ferrocianeto de potássio  
**K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>** - Ferricianeto de potássio  
**LL** - Lepromatoso  
**LR** - Likelihood  
**MB** - Multibacilares  
**Md** - Média dos postos  
**MEV** - Microscopia eletrônica de varredura  
**Mg** - miligrama  
**M. tuberculosis** - *Mycobacterium tuberculosis*  
**M. leprae** - *Mycobacterium leprae*  
**MNT** - Micobactérias não tuberculosas  
**MOTT** - Mycobacteria other than tubercle bacilli  
**Mv** - milivolts  
**NaCl** - Cloreto de sódio  
**OMS** - Organização Mundial de Saúde  
**P** - P valor  
**PB** - Paucibacilares  
**PCR** - Reação em cadeia da polimerase  
**PD** - Prevalência da doença  
**PGL-I** - Glicolípido fenólico  
**PQT** - Poliquimioterapia  
**qPCR** - Reação em cadeia da polimerase (quantitativo)  
**qPCR-HRM** - Quantitative PCR high-resolution melting  
**R** - Spearmam r  
**RLEP** - Gene repetitivo do genoma de *M. leprae*  
**Sens.** - Sensibilidade

**SPE** - Screen Printed Electrode  
**SPCE** - Screen Printed Carbon Electrode  
**TB** - Tuberculose  
**TF** - Tampão fosfato  
**TLN** - Tampão de lise nuclear  
**TT** - Tuberculóide  
**UFU** - Universidade Federal de Uberlândia  
**V** - Volts  
**VC** - Voltametria cíclica  
**VPD** - Voltametria de pulso diferencial  
**V/s** - Volts por segundo  
**μA** - Microampére  
**μg** - Micrograma  
**μl** - Microlitro

## SUMÁRIO

<b>1 - CAPÍTULO I - FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>10</b>
1.1 - Considerações Gerais.....	11
1.2 - Revisão bibliográfica.....	12
1.2.1 - Micobactérias.....	12
1.2.1.1 - Tuberculose.....	14
1.2.1.2 - Hanseníase.....	16
1.2.2 - Biossensores.....	25
1.2.2.1 - Biossensores eletroquímicos.....	27
1.2.2.2 - Eletrodos.....	28
1.2.2.3 - Eletrodos modificados.....	30
1.2.3 - Rodamina.....	31
1.3 - OBJETIVOS.....	34
1.3.1 – Objetivo Geral.....	34
1.3.2 – Objetivos Específicos.....	34
1.4 - REFERÊNCIAS.....	35
<b>2 - CAPÍTULO II – ARTIGO 1.....</b>	<b>47</b>
2.1- Resumo.....	48
2.2 - Introdução.....	49
2.3 - Materiais e métodos.....	52
2.4 - Resultados e Discussões.....	54
2.5 - Conclusão.....	61
2.6 - Referências.....	62
<b>3 - CAPÍTULO III – ARTIGO 2.....</b>	<b>67</b>
3.1 - Resumo.....	68
3.2 - Introdução.....	69
3.3 - Métodos.....	73
3.4 - Resultados.....	76
3.5 - Discussão.....	85
3.6 - Referências.....	89
<b>4 - ANEXO – PATENTE.....</b>	<b>94</b>

# Capítulo I

Fundamentação Teórica

## 1.1 - Considerações Gerais

Métodos que envolvem a detecção eletroquímica têm mostrado novas possibilidades para o diagnóstico de várias doenças. Porém, eletrodos comerciais apresentam limitações como a falta de padronização da área de trabalho e a dificuldade de aderência de algumas biomoléculas à superfície sensorial dificultando o seu uso no diagnóstico.

A busca de novos meios de modificação da superfície de eletrodos *screen-printed* de grafite descartáveis de forma eficiente e com menor custo, levou a utilização da Rodamina 6G para estabilizar e funcionalizar essas superfícies tornando-as mais homogêneas e com maior aderência a biomoléculas.

Técnicas sorológicas e moleculares auxiliam no diagnóstico de micobactérias, porém requerem equipamentos e infraestrutura de alto custo e são pouco sensíveis em alguns casos.

Devido à procura por novas técnicas de diagnóstico para doenças infecciosas como as causadas por micobactérias utilizou-se esses patógenos como modelo experimental para testar a modificação dos eletrodos com rodamina 6G. Cabe ressaltar que esta aplicação serve como exemplo da viabilidade de seu uso, não sendo exclusivamente para este fim e poderá ser utilizado em diagnóstico de outras doenças e/ou reconhecimento de biomoléculas que possuam carboidratos na sua estrutura, utilizando antígenos, anticorpos, peptídeos, enzimas, DNA, RNA e aptâmeros.

O biossensor desenvolvido é capaz de reconhecer amostras que possuam carboidratos em sua estrutura, possibilitando a construção de biossensores universais e estáveis. Neste trabalho foi explorado o diagnóstico de micobactérias como a tuberculose e hanseníase, já que sua resistente parede celular é formada por arranjos complexos de moléculas de carboidratos, lipídios, peptidoglicanos e proteínas, característica do gênero.

## 1.2 - Revisão bibliográfica

### 1.2.1 - Micobactérias

Desde o século XIX doenças infecciosas endêmicas e epidêmicas como sarampo, varíola, gripe, difteria, tuberculose, lepra e outras vinham assolando a população, devido ao desconhecimento sobre a etiologia e a transmissibilidade dessas doenças, o que impedia o avanço de medidas profiláticas, terapêuticas e favorecia o caos infeccioso (DOBSON; CARPER, 1996).

O primeiro representante do gênero descrito como agente causador de doença humana foi o *Mycobacterium leprae*, descrito por Gerhard Armauer Hansen, em 1873. Em 1882, Robert Koch, apresentou ao mundo o *Mycobacterium tuberculosis*, o agente etiológico da tuberculose (TB) contribuindo assim para a criação da microbiologia clínica (KOCH, 1932).

Robert Koch também descreveu outras espécies de micobactérias que não pertenciam ao *M. leprae* e nem ao complexo *M. tuberculosis*, as quais foram então denominadas micobactérias atípicas e receberam várias denominações, como, ambientais, oportunistas, micobactérias que não o bacilo da tuberculose (*Mycobacteria other than tubercle bacilli*– MOTT). Após algumas modificações na nomenclatura elas são conhecidas hoje como micobactérias não tuberculosas MNT (WAYNE et al., 1969; FALKINHAM III, 1996).

As MNTs não eram associadas a doenças humanas e somente em 1954 Timpe e Runyon descreveram os primeiros casos. A partir daí foram apresentados uma série de casos de doenças pulmonares com manifestações semelhantes à tuberculose, mas não foram identificados como portadores da *M. tuberculosis*. Com esses achados fez-se necessária a identificação dessas espécies, assim estudiosos classificaram mais de 50% das espécies após este período (TIMPE; RUNYON, 1954; HARTMANS et al., 2006).

Várias MNT foram isoladas, do homem, de animais e do meio ambiente, e outras características foram observadas. Características morfológicas e bioquímicas foram importantes para identificação de novas espécies e classificação de espécies já descritas (HARTMANS et al., 2006).

O aparecimento de casos de AIDS em meados de 1980 nos estados Unidos modificou o quadro de importância de identificação e diagnóstico das MNT, onde até

então as infecções referiam-se a doenças pulmonares ou de forma localizada em órgãos isolados (WOLINSKY, 1979).

Nos indivíduos HIV positivos observou-se aumento da incidência, a forma de comprometimento da doença e infecções por diferentes espécies de MNT. Estudos da década de 80 demonstraram que até 50% dos portadores de AIDS possuíam algum tipo de MNT (YOUNG et al., 1986).

Estes novos achados estimularam os estudos e aprimoramentos de técnicas de identificações laboratoriais assim como a preocupação e vigilância acerca de infecções por micobactérias não tuberculosas.

No Brasil, o primeiro estudo com MNT foi descrito por Costa Cruz em 1938, no qual apresentou uma infecção cutânea causada pelo *M. fortuitum* (CRUZ, 1938). Após este, várias outras publicações descreveram casos isolados de infecções e o gênero passou a ser mais conhecido devido a um aumento significativo nas taxas de infecções causadas por micobactérias de crescimento rápido (MCR) relacionadas a casos de contaminação hospitalares (FONSECA, 1997).

As micobactérias pertencem ao domínio Bactéria, ordem Actinomycetales, subordem Corynebacterineae e família Mycobacteriaceae, onde possui apenas um gênero *Mycobacterium* (fungus bacterium), nome proposto por Lehmann e Neumann em 1896, em referência à película formada pelo *Mycobacterium tuberculosis* na superfície de meios líquidos, que era similar a película produzida por alguns fungos (COLLINS et al. 1997; GANGADHARAM, JENKINS, 1998).

As espécies desse gênero são definidas como bacilos com dimensões de 0,2-0,7 x 1,0-10µm, imóveis, levemente curvas, algumas vezes retas, finas, aeróbias, não formadoras de esporos e sem cápsula. A parede celular desses microrganismos é rica em lipídios, entre eles os característicos ácidos micólicos, que conferem resistência a soluções álcool-ácidas e podem ser usados para a identificação de espécies micobacterianas (EUZÉBY, 2019).

As células das micobactérias apresentam crescimento mais lento que a maioria das outras bactérias que causam infecção nos seres humanos. Esta lentidão parece estar relacionada à absorção mais demorada de nutrientes, provavelmente devido à grande quantidade de lipídeos da parede celular (ISENBERG, 1992).

O gênero *Mycobacterium* tem sofrido constantes modificações e atualizações haja vista o grande número de novas espécies de micobacterias descobertas. Nos últimos anos, graças aos recentes avanços na identificação e taxonomia, baseados

num melhor conhecimento da genética das micobactérias. São descritas atualmente mais de 190 espécies e 14 subespécies (EUZEBY, 2019).

Estes microrganismos dividem-se em patogênicos e saprófitos, podendo ser isolados de amostras clínicas, água, solo, de outras fontes ambientais, objetos, alimentos, tendo sido encontradas também em material médico (endoscópios e soluções cirúrgicas) (LEÃO et al., 2005). As micobactérias atípicas ou micobactérias não tuberculosas são na maioria saprófitas de vida livre e são menos associadas a doenças (JARZEMBOWSKI; YOUNG, 2008).

Algumas espécies de micobactérias, isoladas frequentemente de materiais biológicos humanos, foram classificadas de acordo com o seu grau de patogenicidade em: patogênicas, potencialmente patogênicas ou raramente patogênicas (TSUKAMURA, 1984). As espécies patogênicas mais importantes para o homem são as do complexo *Mycobacterium tuberculosis* e o *Mycobacterium leprae*. Organismos como os do *Mycobacterium avium-intracellulare* são potencialmente patogênicas, oportunistas e infectam pacientes imunossuprimidos (WATERS et al., 2016).

#### 1.2.1.1 - Tuberculose

A tuberculose (TB) em humanos e outros mamíferos é causada por espécies do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB) que inclui: *Mycobacterium tuberculosis*, o agente etiológico da TB em humanos, *M. africanum*, que causa tuberculose em humanos apenas em certas regiões da África, *M. bovis*, *M. canetti*, *M. caprae* e *M. pinnipedii*, causando TB em mamíferos silvestres e domesticados e *M. microti*, que causa tuberculose apenas em ratos. (FORRELLAD et al., 2013). De todas as espécies, o *M. tuberculosis* é a mais estudada infectando humanos e podendo também infectar animais. Após a domesticação, os seres humanos foram capazes de transmitir a doença aos animais e *M. bovis* emergiu como um patógeno de animais domesticados e selvagens (DELOGU et al., 2013).

A tuberculose é uma doença altamente infecciosa e transmissível, pode ser causada por qualquer uma das sete espécies integrantes do grupo, afeta prioritariamente os pulmões, embora possa acometer outros órgãos e sistemas. A apresentação pulmonar, além de ser mais frequente, é também a mais relevante para a saúde pública, pois é a principal responsável pela transmissão da doença (WHO, 2018).

Estima-se que um quarto da população mundial esteja infectada pelo *Mycobacterium tuberculosis*, porém, os infectados que não possuem condições de resposta imunológica alterada e não adoecerão com a forma ativa da doença podem constituir reservatórios do bacilo (HOUBEN; DODD, 2016).

O maior risco de adoecimento se concentra nos primeiros dois anos após a primo-infecção, mas o período de latência pode se estender por muitos anos. Fatores relacionados à competência do sistema imunológico podem aumentar o risco de adoecimento, e entre estes, destaca-se a infecção pelo HIV. Outros fatores de risco são as doenças ou tratamentos imunossupressores, idade menor do que dois anos ou maior do que 60 anos, diabetes mellitus e desnutrição (BRASIL, 2018b).

A TB está associada a uma morbidade e mortalidade significativas no mundo, com 10,4 milhões de novos casos estimados e mais de 1,4 milhões mortes em 2016. Brasil, Rússia, Índia, China e África do Sul (BRICS), representam quase 50% dos casos mundiais de tuberculose (WHO, 2017).

O Brasil é um dos 22 países priorizados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) que concentram 87% da carga mundial de TB, ocupando a 20ª posição em relação ao número de casos. No país, em 2015, foram diagnosticados mais de 84 mil casos novos de TB, sendo a taxa de incidência de 30,9 casos/100 mil habitantes (BRASIL, 2015).

É importante destacar que anualmente ainda morrem 4,5 mil pessoas por tuberculose no Brasil, doença curável e evitável. Em sua maioria, os óbitos ocorrem nas regiões metropolitanas e em unidades hospitalares. A TB é a quarta causa de morte por doenças infecciosas e a primeira entre as doenças infecciosas definidas em pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (Aids) (BRASIL, 2018c).

O diagnóstico definitivo de TB se dá pela identificação dos bacilos de uma amostra biológica através da baciloscopia, da cultura ou de métodos moleculares. Exames como hemograma, testes bioquímicos e radiológicos podem auxiliar, direcionando o médico para os testes mais específicos. O diagnóstico clínico pode ser considerado, na impossibilidade de se comprovar a suspeita de tuberculose por meio de exames laboratoriais. Nesses casos, deve ser associado aos sinais e sintomas os resultados de outros exames complementares, como imagem e histológicos (DELOGU et al., 2013).

A diferenciação entre membros do complexo *M. tuberculosis* é essencial para o diagnóstico da tuberculose e necessária para o tratamento dos doentes (seleção da

terapêutica adequada) e também é muito útil para fins epidemiológicos, em especial em áreas onde a tuberculose está presente em proporções epidêmicas ou sempre que ocorra a transmissão de *M. bovis* entre os animais ou entre produtos animais e o homem (PARSONS et al., 2011).

A principal distinção entre o complexo *M. tuberculosis* e as micobactérias patogênicas restantes reside nas diferenças dos seus habitats e da sua propagação, bem como a susceptibilidade aos agentes quimioterapêuticos padrões. A maior diferença entre tuberculose e outras micobacterioses é que o agente infeccioso *M. tuberculosis*, é transmitido de pessoa para pessoa através de aerossóis, sendo importante o diagnóstico precoce da tuberculose para interromper a sua propagação (PIERSIMONI; SCARPARO, 2008).

A diferenciação das micobactérias não tuberculosas do complexo *M. tuberculosis*, numa fase inicial do diagnóstico, é muito importante, pois o tratamento é distinto dentre as demais espécies, devido às diferenças na susceptibilidade aos antibióticos (KIM et al., 2006; RIELLO et al., 2016).

A detecção e tratamento precoces são os meios mais eficazes de interromper a transmissão da doença. Porém, carecem de abordagens alternativas de diagnóstico que reduzam o tempo de resposta e mantenham sensibilidade e especificidade aceitáveis, diminuindo custos, dependência de infraestrutura e mão de obra especializados (SURABHI et al., 2018).

#### **1.2.1.2 - Hanseníase**

A hanseníase é uma doença infectocontagiosa crônica causada pelo *Mycobacterium leprae*, um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) de crescimento lento (HASTINGS et al., 1988). Foi identificada em 1873, em Bergen na Noruega, pelo pesquisador Gerhard Henrik Armauer Hansen e foi considerado o primeiro microorganismo patogênico a ser associado com uma doença em humanos. (IRGENS, 2002).

Atua como parasita intracelular obrigatório no corpo do hospedeiro acometendo principalmente a pele e os nervos periféricos, mais especificamente, as células de Schwann e células do sistema mononuclear fagocitário (HASTINGS et al., 1988). A temperatura ótima de crescimento do bacilo é de 27 a 30°C, característica refletida clinicamente nos principais sítios afetados pela doença por serem regiões mais frias do corpo como extremidades dos membros e da face (SHEPARD, 1965).

Estudos anteriores sugerem que o modo de transmissão da hanseníase ocorra pelas vias aéreas superiores (LASTORIA e ABREU, 2014). Menos comumente, a pele também é considerada uma das portas de entrada e saída de *M. leprae* (JOB et al., 2008). Outras rotas de transmissão, como sangue, transmissão vertical e leite materno também foram consideradas possíveis (SANTOS et al., 2001; LASTORIA e ABREU, 2014).

Outros estudos demonstraram que a mucosa bucal pode ser um sítio secundário da transmissão e infecção pelo *M. leprae*, e os contatos com o DNA bacilar podem estar ativamente envolvidos na transmissão. Também mostraram que o DNA bacilífero é mais freqüentemente encontrado na mucosa bucal de pacientes paucibacilares (PB) (MARTINEZ et al., 2011).

No entanto, estudo mais recente envolvendo a análise do DNA por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR) de amostras das biópsias de concha nasal, swabs nasais e da sorologia de pacientes e contatos, comprovou e sistematizou que a via aérea é a principal envolvida na transmissão e disseminação bacilar, e que pacientes não tratados, portadores de bacilos, que entram em contato próximo e prolongado com indivíduos suscetíveis, são a principal fonte de transmissão da doença, assim familiares de pessoas com hanseníase possuem maior chance de adoecer. (ARAUJO et al., 2016).

Supõe-se que indivíduos infectados, mesmo aqueles com infecção subclínica podem ter um período transitório de liberação nasal de bacilos. A presença de seqüências específicas de DNA do *M. leprae* em swabs nasais e a soropositividade para antígenos de bacilos específicos em indivíduos saudáveis que vivem em áreas endêmicas, sugerem que o portador desempenha um papel importante na transmissão da hanseníase (ARAUJO et al., 2012; ARAUJO et al., 2015; ARAUJO et al., 2016; GOULART et al. 2015; FABRI et al., 2015).

A susceptibilidade ao *M. leprae* está ligada principalmente à predisposição genética, imunidade e estado nutricional, mas também pode estar fortemente relacionada a condições econômicas, sociais e ambientais desfavoráveis, somando-se a esses fatores o desconhecimento da população aos sinais e sintomas e a dificuldade de acesso a rede pública de saúde pela população mais vulnerável (GOULART e GOULART, 2008).

Esse micro-organismo possui baixa infectividade, alta patogenicidade e longo período de incubação, em média de 2 a 7 anos. Se não tratada na forma inicial, a

doença quase sempre evolui, torna-se transmissível e pode atingir pessoas de qualquer sexo ou idade, podendo levar a incapacidades físicas (CARVALHO, et al. 2018).

O bacilo não é cultivável *in vitro* e o homem é reconhecido como a única fonte de infecção, embora tenham sido identificados animais infectados como tatu, chimpanzé e macaco mangabei (TRUMAN et al., 2011; DA SILVA, 2018).

A hanseníase continua sendo um problema de saúde pública, ainda é endêmica em algumas regiões como Américas, África e Ásia. Durante 2017, foram notificados 210.671 novos casos em 150 países, e a taxa de detecção foi de 2,77 por 100.000 habitantes. O Sudeste Asiático foi responsável por 73% da sobrecarga de hanseníase global, e dois países, Índia e Indonésia, contribuíram com 67,4% dos novos casos em todo o mundo e 92,6% regionalmente. O Brasil contribuiu com 92,3% de casos novos de hanseníase na região das Américas, sendo o segundo país com maior prevalência de hanseníase no mundo. Os três países com os maiores encargos - Índia (126.164), Brasil (26.875) e Indonésia (15.910) - foram responsáveis por 80,2% da carga global de novos casos de 2017 (WHO, 2018).

Entre 2008 e 2017 a OMS reportou uma diminuição lenta na detecção de novos casos em todo o mundo de 249.007 em 2008 para 210.671 em 2017. No entanto, cinco regiões reportaram aumentos no número de novos casos; 1.032 casos foram relatados na África e 1.745 nas Américas, dos quais 1.657 casos foram em Brasil. Esse aumento é atribuível principalmente à melhor detecção de casos, mas também ao impacto de fatores como a conscientização da hanseníase na comunidade, e a capacidade do sistema de saúde na detecção precoce da hanseníase (WHO, 2018b).

Além de ser uma doença de notificação compulsória e de investigação obrigatória no Brasil, a hanseníase continua sendo uma doença negligenciada. A Sociedade Brasileira de Hansenologia (SBH) afirma que existem lacunas no relato de novos casos em cerca de 530 milhões de pessoas de 64 países “em desenvolvimento”, onde geralmente existem condições favoráveis para a hanseníase, a OMS não reportou aumento no número de casos entre 2016 e 2017. Entretanto, de acordo com a SBH, o Brasil continua com alto índice de diagnósticos de hanseníase e o número real em território nacional pode ser de até 8 vezes maior que os dados oficiais. (SALGADO et al., 2018).

A hanseníase é uma doença complexa e possui formas de ser classificada para melhor tratamento e manejo dos pacientes. A classificação operacional da doença

proposta pela OMS para fins de tratamento, baseia-se no número de lesões, sendo classificadas em paucibacilares (PB) com até 5 lesões de pele e baciloscopia negativa, e multibacilares (MB) com mais de 5 lesões de pele e baciloscopia positiva. Os pacientes PB não são considerados importantes fontes de transmissão da doença, devido à baixa carga bacilar. Contudo, os pacientes MB constituem o grupo transmissor, mantendo-se como fonte de infecção, enquanto o tratamento específico não for iniciado (BRASIL, 2010)

Atualmente a mais aceita classificação da hanseníase e predominante nas pesquisas científicas foi proposta por Ridley e Jopling (1966). Este sistema de classificação subdivide os pacientes de acordo com fatores imunológicos, em cinco grupos distintos: tuberculóide (TT), borderline-tuberculóide (BT), borderline-borderline (BB), borderline-lepromatoso (BL), ou lepromatoso (LL) (RIDLEY e JOPLING, 1966). Assim, temos duas formas polares (LL e TT) e três formas intermediárias (BL, BB, BT). A variedade das formas clínicas é definida por uma vigorosa resposta imune celular no polo tuberculóide e uma progressiva redução na resposta imune celular em direção ao polo lepromatoso, associada com o aumento na carga bacilar, mais lesões na pele e nos nervos (REES e YOUNG, 1994). No grupo Indeterminado (I), enquadram-se aqueles pacientes nos quais os aspectos de diferenciação da hanseníase não se desenvolveram, podendo evoluir para cura espontânea ou desenvolver aspectos clínicos após um período de incubação (GOULART et al., 2008).

Os principais sinais e sintomas da doença de um modo geral estão associados com o acometimento dos nervos periféricos e secundariamente da pele, ocasionando principalmente lesões neurais nos olhos, membros superiores e membros inferiores manifestando-se por alterações na sensibilidade térmica como hiperestesia, hipoestesia e posteriormente anestesia; perda da sensibilidade dolorosa e tátil (GOULART; PENNA; CUNHA, 2002). Quanto às manifestações clínicas tardias, ocorrerá o comprometimento neural em nível troncular havendo parestesias e paresias acarretando sinais característicos da fase avançada da moléstia, correspondendo a lesão nos nervos, o que corresponde a incapacidades físicas e sequelas nos indivíduos (TRINDADE; NEMES, 1992).

A OMS publicou a Estratégia Global para Hanseníase 2016-2020 que visa atingir metas para reduzir a prevalência da doença e uma delas é baseada na busca para desenvolver estratégias e ferramentas que incluem novas técnicas diagnósticas

para detecção precoce de casos, triagem direcionada e monitoramento de contatos domiciliares e sociais, o que consideram crucial para interromper a transmissão e evitar a progressão da hanseníase (WHO, 2016).

O diagnóstico de *M. leprae* é baseado prioritariamente em testes clínicos nos sinais cardinais da doença (manchas avermelhadas ou hipopigmentadas e/ou áreas com perda de sensibilidade; troncos nervosos espessados com perda de sensibilidade e/ou fraqueza nos músculos inervados) e através da epidemiologia, por meio da análise da história e condições de vida do paciente. A avaliação clínica detecta a doença em vez de infecção subclínica e bacteriológica. Cerca de 70% dos casos de hanseníase podem ser diagnosticados somente com base no sinal clínico de lesões de pele com perda sensitiva, porém 30% de pacientes, inclusive pacientes multibacilares (MB) não apresentam sintomas (DUTHIE, et al., 2014).

Testes laboratoriais complementares têm demonstrado uma importante ferramenta no diagnóstico da hanseníase (GOULART e GOULART, 2009). A baciloscopia, pesquisa de bacilos álcool-ácido resistentes é realizado em todos os pacientes com suspeita clínica da doença. É o exame complementar mais importante na hanseníase para identificar o agente causal, permitindo a classificação dos casos em PB ou MB. Entretanto, o exame baciloscópico apresenta baixa sensibilidade, especialmente nas formas paucibacilares e para sua execução, faz-se necessária infraestrutura laboratoriais e profissionais capacitados (LASTORIA; ABREU, 2014).

### ELISA Anti-PGL-I

Técnicas de ELISA (Ensaio de imunoabsorção enzimática) foram concebidos para a detecção e quantificação de substâncias tais como peptídeos, proteínas, anticorpos e hormônios. Esta técnica pode ser utilizada para detecção de anticorpos presentes no soro (ENGVAL; PERLMANN, 1971).

O glicolípido-fenólico-1 (PGL-I) foi um dos primeiros antígenos específicos do *Mycobacterium leprae* a ser isolado, sendo considerado o principal glicolípido presente na parede celular do bacilo. A estrutura química do PGL-I demonstrou que esse glicolípido é formado por uma extremidade lipofílica e um trissacarídeo único que é a região de grande antigenicidade da molécula (HUNTER; FUJIWARA; BRENNAN, 1982).

Uma abordagem da detecção da infecção pelo *Mycobacterium leprae* é o uso do PGL-I nativo como antígeno para o teste sorológico ELISA. É validado como um

método para detecção de novos casos de hanseníase e para um diagnóstico precoce da infecção subclínica uma vez que estes anticorpos refletem um sinal de estimulação antigênica (MOURA, 2008; GOULART e GOULART, 2008).

O *M. leprae* por meio do PGL-I promove um mecanismo complexo de imunorregulação apresentando características diferentes nas diversas formas clínicas (FREHEL; RASTOGI, 1987). Os anticorpos anti-PGL-I estão presentes em grande quantidade nos multibacilares especialmente nos pacientes LL, porém, somente um pequeno número de pacientes PB são reativos por apresentarem baixa concentração de anticorpos circulantes (BURGESS et al., 1988).

PGL-I tem sido utilizado em muitos estudos e na rotina profissional em diversas condutas como auxiliar no monitoramento de contatos (indicador de exposição passiva a caso índice), auxílio ao diagnóstico, classificação das formas clínicas, monitoramento da terapia, diferenciação entre reação e recidiva (VAN BEERS; DE WIT; KLATSER, 1996; GOULART et al., 2007; GOULART et al., 2008).

A sorologia anti-PGL-I mostrou-se eficiente na diferenciação das classificações operacionais mostrando soropositividade nos indivíduos com elevados níveis desse antígeno específico do *M. leprae* quando comparado àqueles com baixos níveis antigênicos (LOBATO et al., 2011; ARAUJO et al., 2015).

Araújo et al. (2015) também demonstrou que a soropositividade para o ELISA anti-PGL-I combinado com outros fatores aumentam o risco de desenvolvimento da doença em contatos. Tem sido demonstrado que esse antígeno pode diferenciar os pacientes MB e PB, evidenciar a eficácia terapêutica, pois observou-se decréscimo dos níveis antigênicos ao longo do tratamento daqueles pacientes não reacionais, por meio do monitoramento da sorologia ELISA (SILVA et al., 2007; LOBATO, et al., 2011).

ELISA anti-PGL-I é o teste mais importante na determinação do aumento da chance de comprometimento neural nos contatos domiciliares assintomáticos com hanseníase (SANTOS et al., 2018).

Outro estudo publicado demonstrou o uso de técnicas de ELISA utilizando o PGL-I nativo e seus derivados semissintéticos para a identificação de indivíduos com infecção subclínica (FABRI et al. 2015).

Um importante estudo no hemocentro do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia levantou a hipótese de que a infecção assintomática entre doadores de sangue pode ser um modo não revelado de transmissão da hanseníase

via transfusão, e utilizaram técnicas de ELISA anti-PGL-I para o monitoramento (GOULART et al., 2015).

Apesar da difícil padronização, o baixo custo do ELISA e os resultados quantitativos fazem com que este teste seja o escolhido para estudos epidemiológicos de grande escala (MOURA, 2008).

A maior desvantagem do diagnóstico sorológico para a hanseníase são as variações laboratoriais, além disso, a sorologia tem menor relevância para o diagnóstico da hanseníase paucibacilar (OSKAM, et al., 2003). E em áreas endêmicas, uma proporção significativa de indivíduos saudáveis podem apresentar sorologia anti-PGL-I positiva (GOULART et al., 2015).

#### Técnica de detecção por PCR

A amplificação de ácido nucleico in vitro, pela reação em cadeia da polimerase (PCR), tornou-se uma das mais potentes e versáteis técnicas utilizadas em pesquisa na atualidade. A técnica de PCR é um método baseado na amplificação enzimática de um fragmento de DNA pela extensão de dois oligonucleotídeos (primers), que hibridizam com fitas complementares de uma sequência molde (alvo) (ROSSETTI; SPERHACKE, 2006).

Portanto, partes de um gene, em geral os *exons* do DNA podem ser amplificados de maneira exponencial com o uso de primers específicos conhecidos para estudo da hanseníase. Vários genes do *M. leprae* podem ser utilizados no desenvolvimento de ensaios de PCR para detecção em amostras clínicas (KANG et al., 2003; MOHANTY et al., 2004; DAYAL et al., 2007; GOULART et al., 2007; ARAUJO et al., 2016; ARAUJO et al., 2017).

A partir da PCR foi possível o sequenciamento do genoma completo do *M. leprae* (COLE et al., 2001), a identificação dos poucos genótipos do bacilo (TRUMAN et al., 2004) e da provável origem da infecção em humanos (MONOT et al., 2005), assim como diversas outras descobertas.

A PCR é uma técnica relativamente rápida, específica e sensível, que permite a amplificação e identificação do DNA de *M. leprae* em amostras contendo pequenas quantidades de bacilos, potencializando a uso de ferramentas moleculares laboratoriais não só na pesquisa, mas também para auxiliar no diagnóstico de hanseníase, na classificação dos pacientes e no monitoramento do tratamento com a PQT (GOULART et al., 2007; GOULART e GOULART, 2008).

A PCR tornou-se uma técnica com múltiplas aplicações e passível de utilização em amostras coletadas das mais diversas fontes, como: biópsias de pele, esfregaços dérmicos, nervos, urina, swabs orais ou nasais, sangue e lesões oculares (SANTOS et al., 1993; JARDIM et al., 2003; PATROCINIO et al., 2005; MARTINEZ et al., 2011; ROSA et al., 2013; REIS et al., 2013; ARAUJO et al., 2016; SANTOS et al., 2018), abrindo assim uma gama imensa de novas possibilidades para investigações sobre os diversos aspectos da hanseníase.

Um avanço importante foi a tecnologia de PCR em tempo-real quantitativa (qPCR). Este método permite a quantificação direta do conteúdo de DNA bacteriano em amostras clínicas e melhorando o tempo de resposta, a sensibilidade e a especificidade na detecção do DNA de *M. leprae*, permitindo resultados mais confiáveis. O procedimento segue o princípio geral da PCR, e sua característica principal é que o DNA amplificado ou o cDNA (DNA complementar) é quantificado à medida que se acumula na reação em tempo real após cada ciclo de amplificação (MARTINEZ, 2006).

Além disso, análises utilizando PCR em tempo real mostraram que o conteúdo total de DNA estimado pelos níveis moleculares pode ser correlacionado com a carga bacteriana, corroborando os dados clínicos, o que pode ser útil para determinar um índice bacteriológico molecular, ajudando a definir a forma clínica dos pacientes (TRUMAN et al., 2008; RUDEEANEKSIN et al., 2008).

Um estudo particular que descreveu uma técnica de qPCR para detecção do gene repetitivo RLEP do genoma de *M. leprae*, por meio da amplificação e hibridização de sonda específica, indicou o potencial de detecção de aproximadamente 10 bacilos em uma amostra, com quantificação da carga bacteriana pela interpolação com o número de moléculas de DNA de um controle padrão conhecido (TRUMAN et al., 2008) e tem sido replicado com resultados, demonstrando que a carga bacilar está diretamente proporcional ao número de cópias de DNA de *M. leprae* (ARAÚJO et al., 2016).

Outro estudo recente com RLEP evidenciou a importância da utilização da qPCR como técnica complementar no diagnóstico da hanseníase (AZEVEDO et al., 2017).

A qPCR pode auxiliar na definição do diagnóstico da hanseníase em pacientes suspeitos com lesões clinicamente sugestivas ou atípicas, a detecção do DNA bacilífero em uma lesão oral por PCR em tempo-real não apenas melhorou o

diagnóstico da hanseníase, mas também auxiliou na classificação da forma clínica (MARTINEZ et al., 2011).

Um interessante estudo indicou que, de fato, o risco de progredir para doença ativa aumenta se um contato domiciliar for positivo para qPCR no sangue (REIS et al., 2013).

Com a evolução da qPCR também foi observada aplicabilidade na vigilância da resistência a drogas em larga escala na hanseníase, indentificando variantes genéticas a medicamentos através de genes alvos em qPCR-HRM (high resolution melting), reduzindo o custo e tempos que seriam gastos com sequenciamento de DNA (ARAUJO et al., 2017).

Um estudo mediu a ocorrência de comprometimento neural periférico em contatos domiciliares assintomáticos de hanseníase através da qPCR associada a outras técnicas sorológicas e neurofisiológicas e identificaram uma chance quatro vezes maior de desenvolvimento de neuropatia de hanseníase nesses indivíduos, justificando o tratamento precoce e a profilaxia (SANTOS et al., 2018).

Em outro trabalho do mesmo grupo, indicaram que ferramentas imunológicas, moleculares e neurofisiológicas foram importantes para diagnosticar pacientes com hanseníase neural primária e devem ser implementadas a fim de alcançar um tratamento eficaz e reduzir as deficiências resultantes (SANTOS et al., 2017).

Com a qPCR foi possível o monitoramento dos contatos domiciliares assintomáticos que são comprovadamente abrigados pelo agente da hanseníase e que tem um significado crítico na ação de prevenção e controle desta doença, uma vez que a avaliação desses indivíduos surge como de importância na detecção precoce do *M. leprae* (CARVALHO et al., 2018).

O monitoramento e quimioprofilaxia dos contatos domiciliares são críticos para obter a interrupção da transmissão da hanseníase em países endêmicos. Assim, é provável que um teste de PGL-I em combinação com qPCR possa ajudar a identificar a população de maior risco entre os contatos domiciliares (ARAUJO et al., 2012; SANTOS et al., 2018).

A PCR apresenta sensibilidade de até 100% em casos de hanseníase multibacilar, mas geralmente é pouco sensível (inferior a 50%) em casos de hanseníase paucibacilar (TRUMAN et al. 2008; AZEVEDO et al., 2017; TURANKAR et al., 2015; PATROCINIO et al, 2005; GOULART et al., 2007). Além disso, a tecnologia de PCR requer equipamentos e infraestrutura de alto custo, são testes para

diagnóstico diferencial e complementar e não são utilizados na rotina dos serviços de atenção primária, e sim, nos serviços de referência e em pesquisas (GOULART; GOULART, 2008).

Portanto, existe uma clara necessidade e interesse crescente no desenvolvimento de métodos simples, rápidos, específicos e sensíveis para detectar infecção subclínica e que possa ser usado tanto para confirmar o diagnóstico em pessoas com suspeita da doença como para rastrear contatos de pacientes em grupos populacionais com alto índice de risco para desenvolver a hanseníase (ROSET et al., 2016).

Métodos que envolvem a detecção eletroquímica têm mostrado novas possibilidades para o diagnóstico de doenças infecciosas ou outras doenças (CORTINA et al., 2016).

### **1.2.2 - Biossensores**

O biossensor é um dispositivo integrado e autossuficiente capaz de fornecer informações analíticas, quantitativas ou semi-quantitativas utilizando um elemento de reconhecimento biológico (receptor) que garante a especificidade e produz uma resposta que é traduzida pelo componente físico em um sinal óptico ou elétrico. Ou seja, o objetivo de um biossensor é produzir um sinal proporcional, em magnitude ou frequência, à concentração do analito (NAKAMURA; KARUBE, 2003).

O receptor consiste em um material de origem biológica, tais como: enzimas, organelas, tecido animal ou vegetal, microrganismo, antígeno ou anticorpo, ácidos nucleicos, entre outros, que é imobilizado em um suporte, conectado a um sensor base (transdutor) que converte o reconhecimento biológico em um sinal mensurável (TRÉVENOT et al., 2001).

Os biossensores podem ser classificados como catalíticos que geralmente utilizam enzimas que são acopladas ao eletrodo de trabalho. Estas têm uma grande atividade aliada a uma elevada especificidade para determinados substratos, catalisando a formação de produtos eletroativos para serem detectados. Ou biossensores de afinidade que são baseados na formação de ligações entre o analito e o componente de reconhecimento biológico, utilizando biomoléculas, a ligação depende essencialmente da complementaridade entre o analito e o centro ativo do componente biológico, quer em tamanho como em forma, o que permite uma elevada seletividade e sensibilidade (RICCARDI et al. 2002).

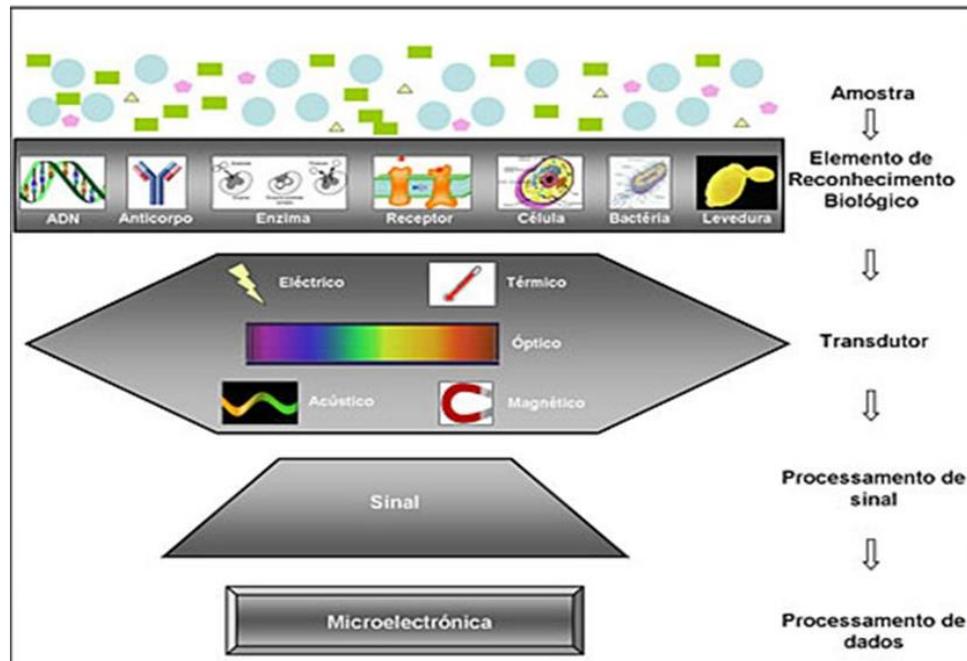
Dentre os métodos de imobilização, os mais utilizados tem sido: ligação covalente, adsorção física, oclusão em gel ou filme polimérico que podem se formar através de simples imersão do eletrodo em solução contendo o polímero ou aplicação de potencial elétrico no eletrodo contendo solução de monômeros (eletrodeposição) (TRÉVENOT et al. 2001).

As áreas de aplicações dos biossensores são as mais variadas podendo estar presente em campos como saúde humana, veterinária, agricultura, indústria alimentícia, farmacêutica, meio ambiente, defesa da população civil, controle de infecção hospitalar entre outras, por apresentam características que os tornam uma ferramenta cada vez atrativa (HOSSEINI, et al. 2014).

Dentre as características desejáveis ou ideais em relação a um biossensor podemos considerar: seletividade, que é a capacidade de distinguir a molécula de interesse dentre as demais presentes na amostra; sensibilidade, o transdutor é capaz de converter um sinal biológico em um sinal mensurável proporcional a concentração do analito na amostra; estabilidade, tempo em que uma biomolécula permanece com suas características básicas de biorechecimento; reprodutibilidade, onde o experimento pode ser repetido por aplicação do mesmo protocolo, obtendo resultados similares ao original; baixo custo e simplicidade de operacionalização (FORTINA et al., 2001).

Os biossensores podem ser classificados de acordo com a biocamada e o transdutor utilizado. Quanto a biocamada podem ser: enzimáticos, que utilizam enzimas como elementos bioreceptores; celulares, que usam microrganismos, especialmente para o monitoramento ambiental de poluentes e imunossensores, que são baseados na reação imunológica, sendo o antígeno ou anticorpo o receptor imobilizado na superfície do sensor (Fig. 1) (KENNETH et al., 2010)

De acordo com o transdutor utilizado, o biossensor pode ser classificado como: óptico, que se baseiam em mudanças nas propriedades ópticas das substâncias que podem ser absorção, índice de refração, fluorescência, fosforescência, refletividade e comprimento de onda; piezoelétricos, que detectam a massa (relacionada a oscilação da frequência dos cristais de quartzo); calorimétrico, que usam o calor gerado por reações catalisadoras para medir a concentração do analito e eletroquímico, onde o reconhecimento biológico é traduzido em sinal elétrico de acordo com a figura 1 (SAMPIETRO et al., 2011).



**Figura 1.** Esquema de um biossensor.

(Fonte: [http:// https://betaeq.com.br/index.php/2015/09/30/nanotecnologia-na-industria-de-alimentos](http://https://betaeq.com.br/index.php/2015/09/30/nanotecnologia-na-industria-de-alimentos). Acesso em: 23/04/2019)

### 1.2.2.1 - Biossensores eletroquímicos

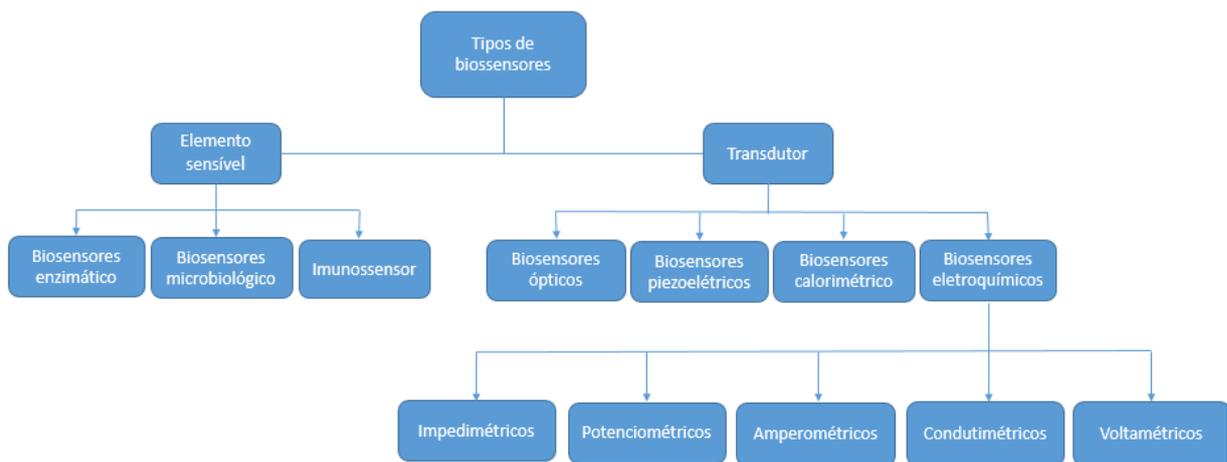
Os biossensores eletroquímicos são provavelmente a maior classe de sensores químicos, sendo utilizados na detecção das mais diversas moléculas, micro-organismos, entre outros. São os mais comuns e estudados para uso em análises clínicas e se baseiam no preparo de eletrodos quimicamente modificados com materiais biológicos imobilizados.

Podem ser divididos em amperométrico, potenciométrico, voltamétrico, condutimétrico e impedimétrico (fig. 2). Os amperométricos e potenciométricos tem sido os mais utilizados. Os amperométricos baseiam-se nas medidas de intensidade de corrente em uma célula eletroquímica a um potencial fixo, sendo a corrente gerada por reação de oxidação ou redução eletroquímica de espécies eletroativas na superfície sensível, proporcional à concentração do analito. Nessa técnica, usualmente o potencial de eletrodo de trabalho é mantido constante em relação ao eletrodo de referência, como por exemplo o glicosímetro (TRÉVENOT et al., 2001).

Nas medidas potenciométricas, a magnitude do potencial medido em correntes quase nulas e é decorrente da diferença de potencial entre um eletrodo indicador e um eletrodo de referência, ou seja, mede diferenças de potencial após a aplicação de

valores de corrente fixas, por exemplo o medidor de pH (MOHANTY;K OUGIANOS, 2006).

Ao contrário dos amperométricos, os biossensores voltamétricos funcionam com uma variação de potencial para o sistema de detecção até ocorrer a oxidação ou redução do analito com variação da corrente de pico. Os biossensores condutimétricos medem a condutância entre um par de eletrodos metálicos tendo como consequência a produção de espécies iônicas, resultantes da interação de uma enzima com o analito. Por fim os biossensores impedimétricos são aqueles que utilizam medidas de impedância eletroquímica para a detecção da interação analito-sonda na superfície modificada do eletrodo (MOHANTY;K OUGIANOS, 2006).



**Figura 2.** Diagrama dos tipos de biossensores.

### 1.2.2.2 - Eletrodos

A escolha da superfície onde irão ocorrer as biorreações (eletrodos) é uma parte fundamental no processo de confecção de biossensores. Os sensores eletroquímicos com eletrodos descartáveis tem sido uma opção interessante na aplicação em vários tipos de sistemas, uma vez que podem ser produzidos em massa, a um baixo custo e sem algumas limitações apresentadas pelos eletrodos sólidos, como a falta de repetibilidade da área ativa entre polimentos sucessivos e a dificuldade de regeneração da superfície após o uso acarretando maior custo na execução (NASCIMENTO; ANGNES, 1998).

O elétrodo impresso por sistema de serigrafia é chamado de SPE (*Screen Printed Electrode*) ou *silk-screen*. Tem sido empregado com grande sucesso por

possibilitar a produção em massa com menor custo, simplicidade de utilização, alta sensibilidade, seletividade, precisão, estabilidade e respostas rápidas além de poderem ser descartados (NASCIMENTO; ANGNES, 1998). Os SPEs consistem em um filme depositado sobre um substrato que vai servir de suporte e fornecer superfície para impressão do eletrodo, geralmente de PVC ou cerâmica de alumina. É importante que o material do substrato seja termicamente e quimicamente inerte, com baixa corrente residual e alta condutividade elétrica, capazes de resistirem às gerações de sinais produzidas pelos biossensores. Em seguida são depositadas as tintas sobre o substrato, elas podem ser condutoras e dielétricas. Nas tintas condutoras o material utilizado pode ser pó de metais como ouro, platina, prata, paládio e pó de carbono, as quais estão dispersas no ligante. O carbono tem sido amplamente empregado como matéria prima para confecção de eletrodos devido suas características como elevada inércia química e inércia eletroquímica, esta última numa ampla faixa de potenciais; baixa corrente residual; alta condutividade elétrica e propiciar uma fácil regeneração da superfície. Em geral, este filme é parcialmente coberto por uma segunda camada de um isolante para definir uma área de contato elétrico numa extremidade e outra área para ser a superfície do eletrodo (BRAININA; BOND, 2004).

Os eletrodos impressos possuem a vantagem de serem descartáveis, além da facilidade de miniaturização, pois pelo seu formato planar, propicia a sua integração a pequenos dispositivos portáteis. O sistema integrado de três eletrodos - eletrodo de trabalho, eletrodo de referência e contra eletrodo viabilizam sua utilização em pequenos equipamentos portáteis.



**Figura 3.** Esquema ilustrativo de um Eletrodo impresso (SPE) com Sistema integrado de três eletrodos

Fonte: dropsens.com

### 1.2.2.3 - Eletrodos modificados

Os eletrodos *screen-printed* apesar de serem aplicados em uma gama de situações apresentam uma limitação já que na maioria dos casos necessitam de modificação da superfície objetivando principalmente o controle das reações que ocorrem na interface e propiciando maior seletividade para um determinado analito. A grande dificuldade desses eletrodos comerciais é a falta de padronização da área de trabalho mesmo em eletrodos feitos na mesma linha de produção, assim como a dificuldade de aderência de algumas biomoléculas a superfície da área de trabalho. E apesar de serem descartáveis há um custo maior por não serem reutilizados.

Porém a versatilidade dos eletrodos possibilita a combinação com reagentes específicos, com objetivo de modificar sua superfície, controlando as reações físico-químicas que ocorrem na interface, propiciando maior reatividade e seletividade ampliando significativamente as suas aplicações (CERRATO-ALVAREZ et al., 2018).

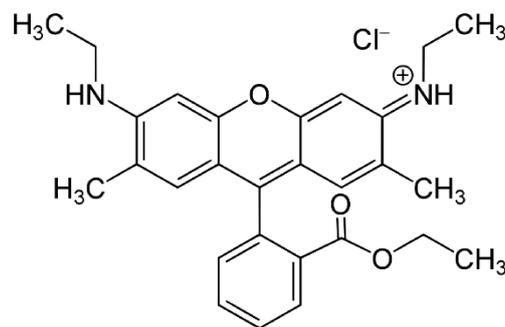
Conceitua-se eletrodos quimicamente modificados (EQM), aqueles que tem imobilizado, em suas superfícies, espécies quimicamente ativas como filme ou camada monomolecular, multimolecular, iônico ou polimérico objetivando controlar as propriedades físico-químicas da interface eletrodo-solução (EDWARDS et al., 2007). Desta forma, a utilização de eletrodos quimicamente modificados (EQM) é uma área em franca expansão, principalmente no aspecto do desenvolvimento de novos materiais e novos métodos de modificação de superfície de eletrodos. O uso de camadas de agentes modificadores sobre a superfície do eletrodo base tem sido a forma mais comum de modificar a superfície de um eletrodo. (CASTILLO et al., 2013).

Essa combinação entre a versatilidade dos eletrodos impressos e a possibilidade de modificação da sua superfície com reagentes específicos, tem ampliado significativamente as suas aplicações. Existem na literatura eletrodos modificados das mais diversas formas como com filme de mercúrio (WANG, 1994), filme de bismuto (WANG et al., 2014), filme de chumbo (BOBROWSKI et al., 2014), nanopartículas de ouro (ASADOLALLAHI-BABOLI et al., 2014), nanopartículas de óxido de níquel (RAFIEE; FAKHARI, 2013) e filmes poliméricos que também são largamente utilizados para este fim (SOARES et al., 2017).

Buscando novos meios de modificação da superfície dos eletrodos de forma eficiente e com menor custo, investigou-se a utilização da rodamina 6G como composto orgânico para esse fim.

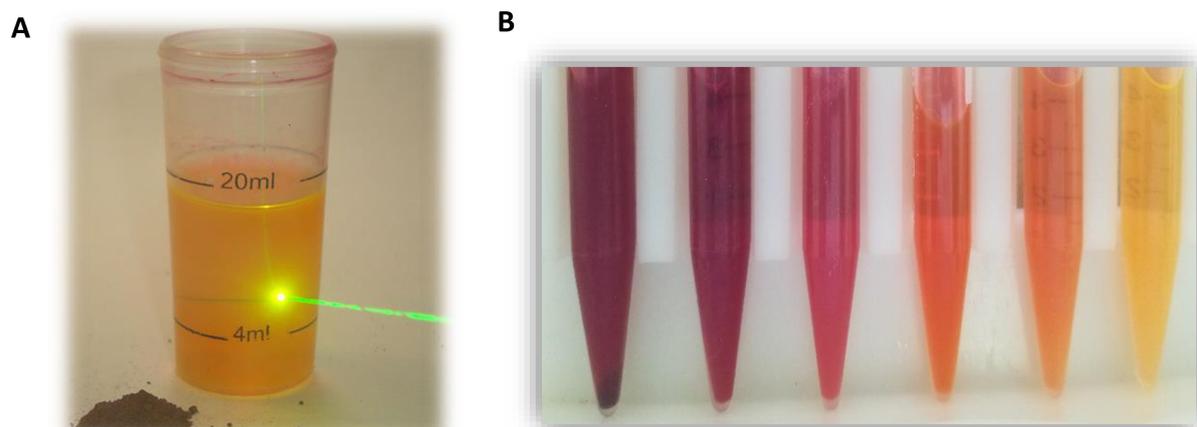
### 1.2.3 - Rodamina

As rodaminas são uma família de compostos orgânicos usados como corantes, conhecidas como fluoronas, a rodamina 6G é um composto catiônico fluorescente de fórmula  $C_{27}H_{29}ClN_2O_3$  (GEORGES et al., 1996). Esses corantes têm sido muito utilizados como agentes de rastreamento em estudos de água, poluição e pulverização de pesticidas aéreos e como corantes de drogas, cosméticos, têxteis e tintas. Estes compostos são muito utilizados em aplicações biotecnológicas, como microscopia de fluorescência, citometria de fluxo, espectroscopia de fluorescência e ELISA (VERMA et al., 2018).



**Figura 4.** Molécula da Rodamina 6G

A Rodamina 6G também é conhecida como Rodamina 590, R6G, Rh6G, Basic Red 1 ou Basic Rhodamine Yellow. Em condições normais de pressão e temperatura, este composto é um sólido cristalino vermelho-púrpura escuro, castanho ou preto. Tem massa molar  $479,02g\ mol^{-1}$  e uma densidade de  $1,26g\ cm^3$ . É muito solúvel em água e em diversos solventes orgânicos. Embora muito solúvel, esta forma é bastante corrosiva para todos os metais e ligas, exceto aço inoxidável. Outras fórmulas são menos solúveis, mas menos corrosivas. Tem uma grande foto-estabilidade e um elevado rendimento quântico (quantum yield) de fluorescência (0,95) e apresenta máximo de absorção aos 530nm. Este corante é produzido a partir da condensação de 3-etilamino-p-cresol (3-etilamino-4-metilfenol) com anidrido ftálico, seguido de esterificação com etanol por catálise ácida (GEORGES, et al., 1996).



Fonte: [https://pt.wikipedia.org/wiki/Rodamina\\_6G#cite\\_ref-3](https://pt.wikipedia.org/wiki/Rodamina_6G#cite_ref-3)

**Figura 5.** Cloreto de rodamina 6G em pó misturada com metanol, emitindo luz amarela sob iluminação de laser verde (A). Coloração da Rodamina 6G em diferentes concentrações, diluídas em água (B).

Normalmente corantes catiônicos deste tipo são usados em lasers e como moléculas de prova em diversas aplicações biológicas, principalmente por causa de sua baixa toxicidade, eficiência quântica, pequena dependência de fatores ambientais, e suas características fluorescentes não se alteram ao longo de várias horas se sua solução aquosa for continuamente agitada. (ARCOUMANIS et al., 1990).

Compostos planares (como brometo de etídio) que possuam anéis aromáticos podem ser usados como indicadores eletroquímicos por interagirem com DNA através de ligações de hidrogênio com bases nitrogenadas (RICHARDS; RODGERS, 2007).

Muitos estudos relatam o azul de metileno, brometo de etídio e tetrametilbenzidina como indicadores de DNA (BALVEDI et al., 2014; TALEATAT et al., 2014). Uma vez que compostos orgânicos podem oxidar, reduzir e interagir com biomoléculas (ALVES-BALVEDI et al., 2016).

Nas análises eletroquímicas a rodamina é utilizada na detecção de íons metálicos (KAMAL et al., 2013; KIM et al., 2013).

A rodamina 6G é bastante utilizada em espectroscopia de Raman como modelo de analito para testar superfícies modificadas, como no caso de modificação com nitrato de prata para construção de biossensor para câncer colorretal e em

superfícies revestidas com nanoestruturas de ouro, devido aos sinais detectáveis de fluorescência emitidos por esse corante (ORSÁGOVÁ et al., 2018 / TRAN et al., 2018).

A rodamina 6G é uma interessante molécula de aplicação tecnológica e comumente utilizada em microscopia, citometria de fluxo, espectroscopia, ELISA e Ramam. Mas não foram encontradas utilizações do corante em biossensores eletroquímicos ou no preparo de superfícies para imobilizar biomoléculas em eletrodos.

Com essas análises, testou-se a Rodamina 6G como mediador de elétrons na superfície da área de trabalho de eletrodos comerciais *screen-printed* por apresentarem afinidade com carboidratos e proteínas, como antígenos e anticorpos, tornando assim a superfície mais receptiva a elementos biológicos, podendo ser útil no preparo de técnicas de sensoriamento biológico e diagnóstico de doenças.

## 1.3 – Objetivos

### 1.3.1 – Objetivo Geral

Construir um biossensor eletroquímico utilizando a rodamina 6G como modificador da superfície de eletrodos de grafite descartáveis para detecção de micobactérias visando avaliar sua utilização potencial para o diagnóstico de tuberculose e hanseníase.

### 1.3.2 - Objetivos Específicos

1. Avaliar a aplicação da Rodamina 6G como modificador de eletrodos *screen-printed* de grafite, assim como otimizar as concentrações e a forma de utilização;
2. Padronizar a utilização dos eletrodos com antígenos e anticorpos específicos para micobactérias e as diluições a serem empregadas;
3. Desenvolver um biossensor eletroquímico para detecção de amostras de cultura de *M. tuberculosis* e sua diferenciação de outras espécies de micobactérias;
4. Desenvolver um biossensor eletroquímico para detecção de *M. leprae* em amostras de raspado dérmico de pacientes diagnosticados com hanseníase, e testar sua seletividade frente a contatos saudáveis;
5. Correlacionar os resultados da detecção eletroquímica da hanseníase com os resultados da sorologia ELISA anti-PGL-1 e qPCR para detecção de DNA de *M. leprae*;
6. Avaliar a utilização da nova técnica de detecção eletroquímica para o diagnóstico da hanseníase.

#### 1.4 - Referências

- ALVES-BALVEDI, R. P. et al. Use of 3,3',5,5'tetramethylbenzidine as new electrochemical indicator of DNA hybridization and its application in genosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 15, n. 85, p. 226-231, Sep. 2016.  
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.05.016>
- ARCOUMANIS, C.; MCGUIRK, J. J.; PALMA, J. M. L. M. On the use of fluorescent dyes for concentration measurements in water flows, ed. E.i. **Fluids**, 1990.
- ASADOLALLAHI-BABOLI, M.; MANI-VARNOSFADERANI, A. Rapid and simultaneous determination of tetracycline and cefixime by mean of gold-nanoparticles-screen-printed gold electrodes and chemometrics tools. **Measurements**, v. 47, p. 145-149, Jan. 2014.  
<https://doi.org/10.1016/j.measurement.2013.08.029>
- ARAUJO, S. et al. Molecular Evidence for the Aerial Route of Infection of *Mycobacterium leprae* and the Role of Asymptomatic Carriers in the Persistence of Leprosy. **Clinical Infectious Disease**, v. 63, n. 11, p. 1412-1420, Dec. 2016.  
<https://doi.org/10.1093/cid/ciw570>
- ARAUJO, S. et al. Risk-benefit assessment of Bacillus Calmette-Guérin vaccination, anti-phenolic glycolipid I serology, and Mitsuda test response: 10-year follow-up of household contacts of leprosy patients. **Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. Revista**, v. 48, p. 739-745, Nov/Dec. 2015.  
<https://doi.org/10.1590/0037-8682-0245-2015>
- ARAUJO, S. et al. qPCR-High resolution melt analysis for drug susceptibility testing of *Mycobacterium leprae* directly from clinical specimens of leprosy patients. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, vol. 11, n. 6, p. e0005506, Jun. 2017.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005506>
- ARAUJO, S. et al. Unveiling healthy carriers and subclinical infections among household contacts of leprosy patients who play potential roles in the disease chain of transmission. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, p. 55-59, Dec. 2012.  
<https://doi.org/10.1590/S0074-02762012000900010>
- AZEVEDO, M. C. et al. qPCR detection of *Mycobacterium leprae* in biopsies and slit skin smear of different leprosy clinical forms. **Brazil Journal Infectious Disease**, v. 21, n. 1, p.71-78, Jan. 2017.  
<https://doi.org/10.1016/j.bjid.2016.09.017>
- BAHMANYAR, R. E. et al. Leprosy diagnostic test development as a prerequisite towards elimination: requirements from the user's perspective. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v. 10, n. 2, p. e0004331, Feb. 2016.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004331>
- BALVEDI, R. P. A. et al. Detection of a Specific Biomarker for Epstein-Barr Virus Using a Polymer-Based Genosensor. **International Journal Molecular Sciences**. v. 15, n. 5, p. 9051-9066, May. 2014.

<https://doi.org/10.3390/ijms15059051>

BOBROWSKI, A. et al. A novel screen-printed electrode modified with lead film for adsorptive stripping voltammetric determination of cobalt and nickel. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 191, p. 291-297, Feb. 2014.

<https://doi.org/10.1016/j.snb.2013.10.006>

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico**. v. 46, n. 9, 2015. Disponível em: <<http://u.saude.gov.br/images/pdf/2015/marco/25/Boletim-tuberculose-2015.pdf>>. Acesso em: 23 jan. 2019.

BRASIL. Ministério da saúde. **Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil**, 2011. Disponível em: <[http://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_recomendacoes\\_controle\\_tuberculose\\_brasil.pdf](http://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/manual_recomendacoes_controle_tuberculose_brasil.pdf)>. Acesso em 23 jan. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias**. 1.ed. Brasília, 2008a. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual\\_laboratorio\\_tb.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_laboratorio_tb.pdf)>. Acesso em 20 set. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica. **Hanseníase**. 7<sup>a</sup> ed. 2010. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/gve\\_7ed\\_web\\_atual\\_hansenise.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/gve_7ed_web_atual_hansenise.pdf)>. Acesso em: 23 jan. 2019.

BRASIL. Ministério da saúde / Secretaria de Vigilância em Saúde, 2018a. **Boletim epidemiológico** disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/31/2018-004-Hansenise-publicacao.pdf>>. Acesso em 21 jan. 2019.

BRASIL. Ministério da saúde / Secretaria de Vigilância em Saúde. **Protocolo de vigilância da infecção latente pelo Mycobacterium tuberculosis no Brasil**. Brasília 2018b. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/setembro/28/Protocolo-de-vigil-ncia-da-ILTB-2018.pdf>>. Acesso em 20 jan. 2019.

BRASIL. Ministério da saúde / Secretaria de Vigilância em Saúde. **Panorama da tuberculose no Brasil: Diagnóstico situacional a partir de indicadores epidemiológicos e operacionais**. Brasília 2018c. Disponível em: <[http://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/tuberculose\\_brasil\\_indicadores\\_epidemiologicos\\_operacionais.pdf](http://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/tuberculose_brasil_indicadores_epidemiologicos_operacionais.pdf)>. Acesso em: 20 jan. 2019.

BRAININA, K. H. Z.; BOND, A. M. **Analytical Chemistry**, v. 67, p. 2586, 1995.

<https://doi.org/10.1021/ac00111a015>

BURGESS, P. J. et al. "Serological tests in leprosy. The sensitivity, specificity and predictive value of ELISA tests based on phenolic glycolipid antigens, and the

implications for their use in epidemiological studies". **Epidemiology and Infection**, vol. 101, n. 1, p. 159-71, Aug. 1988.

<https://doi.org/10.1017/S0950268800029320>

CARVALHO, R. S. et al. Early detection of *M. leprae* by qPCR in untreated patients and their contacts: results for nasal swab and palate mucosa scraping. **European Journal Clinical Microbiology Infectious Disease**, v. 37, n. 10, p. 1863–1867, Jul. 2018.

<https://doi.org/10.1007/s10096-018-3320-9>

CASTILLO, J. J. et al. Detection of cancer cells using a peptide nanotube–folic acid modified graphene electrode, **The Analyst**, v. 138, n. 4 p. 1026–1031, Feb. 2013.

<https://doi.org/10.1039/C2AN36121C>

COLE, S. T. et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. **Nature**, v. 409, n. 6823, p.1007-1011, 2001.

<https://doi.org/10.1038/35059006>

COLLINS, C. H.; GRANJE, J. M.; YATES, M. D. **Identification of species. In: Tuberculosis bacteriology: organization and Practice** 2nd ed. Oxford: Butterworth-Heinemann, 1997. p. 39.

CORTINA, M. E. et al. Electrochemical magnetic microbeads-based biosensor for point-of-care serodiagnosis of infectious diseases. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 80, p. 24–33, Jan. 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.01.021>

CRUZ, J.C. *Mycobacterium fortuitum* um novo bacilo ácido resistente patogênico para o homem. **Acta med.Port**, v. 1, p. 297-301, 1938.

DA SILVA, M. B. et al. Evidence of zoonotic leprosy in Pará, Brazilian Amazon, and risks associated with human contact or consumption of armadillos. **PLOS Neglected Tropical Diseases** v. 12, n. 6, p e0006532, Jun 2018.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006532>

DAVEY, T. F.; REES, R. J. The nasal discharge in leprosy: clinical and bacteriological aspects. **Leprosy Review**, v. 45, n. 2, p. 121-34, Jun 1974.

<https://doi.org/10.5935/0305-7518.19740014>

DAYAL, R. et al. PCR and in-situ hybridization for diagnosis of leprosy. **Indian J Pediatr**, v. 74. N. 7, n. 645-8, Jul. 2007.

<https://doi.org/10.1007/s12098-007-0115-x>

DELOGU, G.; SALI, M.; FADDA, G. The biology of *Mycobacterium Tuberculosis* Infection. **Mediterranean Journal of Hematology Infectious Diseases**, v. 5, n. 1, Nov. 2013.

<https://doi.org/10.4084/mjhid.2013.070>

DOBSON, A. P.; CARPER, E.R. Infectious diseases and human population history: throughout history the establishment of disease has been a side effect the growth of civilization. **Bioscience**, v. 46, n. 2, p. 115-126, Fev. 1996.

<https://doi.org/10.2307/1312814>

DONOGHUE, H. D.; HOLTON, J.; SPIGELMAN, M. PCR primers that can detect low levels of *Mycobacterium leprae* DNA. **Journal Medical Microbiology**, v. 50, n. 2, p.177-182, Feb. 2001.

<https://doi.org/10.1099/0022-1317-50-2-177>

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

<https://doi.org/10.1128/JCM.02085-13>

EDWARDS, G. A.; BERGREN, A. J.; PORTER, M. D. Chemically Modified Electrodes. In: ZOSKI, C. G. Handbook of Electrochemistry. **Elsevier**. p. 295-327, 2007.

<https://doi.org/10.1016/B978-044451958-0.50021-5>

EUZÉBY, J. P. **List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature - Genus Mycobacterium**. Disponível em: <<http://www.bacterio.net/mycobacterium.html>>. Acesso em: 20 jan 2019.

FABRI, A. C. O. et al. Antigen-specific assessment of the immunological status of various groups in a leprosy endemic region. **BMC Infectious Diseases**, v. 15, p. 218, May, 2015.

<https://doi.org/10.1186/s12879-015-0962-4>

FALKINHAM III, J. O. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. **Clin. Microbiolog. Rev.** Washington, v. 9, p. 177-215, 1996.

<https://doi.org/10.1128/CMR.9.2.177>

FALKINHAM III, J. O. Nontuberculous mycobacteria in the environment. **Clinics Chest Medicine**, v. 23, n.3, p. 529-551, Sep. 2009.

[https://doi.org/10.1016/S0272-5231\(02\)00014-X](https://doi.org/10.1016/S0272-5231(02)00014-X)

FONSECA, L. S., GONTIJO, F. P. P. Micobacterias atípicas isoladas no Rio de Janeiro. Identificação preliminar pela morfologia colonial. **Rev Microbiol.** São Paulo, v. 9, p. 125-130, 1978.

FORTINA, P. et al. Surrey in biochip technology Options and Applications of DNA Microarrays. **Harwood Academic Publishers**, Philadelphia, p. 185-216, 2001.

FORRELLAD, M. A. et al. Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Virulence**, v. 4, n. 1, p. 3-66, Jan. 2013.

<https://doi.org/10.4161/viru.22329>

GANGADHARAM, P.R.J., JENKINS, P.A. Mycobacteria. I. **Basic Aspects**. New York, NY: Chapman & Hall. 1998.

<https://doi.org/10.1007/978-1-4615-7511-5>

GEORGES, J.; ARNAUD, N.; PARISE, L. Limitations arising from optical saturation in fluorescence and thermal lens spectrometries using pulsed laser excitation: Application to the determination of the fluorescence quantum yield of rhodamine 6G. **Applied Spectroscopy**, v. 50, n.12, p. 1505-1511, Dec. 1996.

<https://doi.org/10.1366/0003702963904511>

GOULART, I. M. B. et al. Asymptomatic leprosy infection among blood donors may predict disease development and suggests a potential mode of transmission. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, p. JCM.01305-15-4, Jul. 2015.

<https://doi.org/10.1128/JCM.01305-15>

GOULART, I. M. et al. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA in skin lesions of leprosy patients by PCR may be affected by amplicon size. **Archives of Dermatological Research**, v. 299, n. 5-6, p. 267-71, Aug. 2007.

<https://doi.org/10.1007/s00403-007-0758-5>

GOULART, I. M. et al. Risk and Protective Factors for Leprosy Development Determined by Epidemiological Surveillance of Household Contacts. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 15, p. 101-105, Nov. 2007.

<https://doi.org/10.1128/CVI.00372-07>

GOULART, I. M. B.; GOULART, L. R. Leprosy: diagnostic and control challenges for a worldwide disease. F.I.: 1.596. **Archives of Dermatological Research**, v. 300, p. 269-290, Jul. 2008.

<https://doi.org/10.1007/s00403-008-0857-y>

GOULART, I. M. B.; GOULART, L. R. Leprosy pathogenetic background: a review and lessons from other mycobacterial diseases. **Arch Dermatol Res**, v. 301, n. 2, p.123-37, Feb. 2009.

<https://doi.org/10.1007/s00403-008-0917-3>

GOULART, I. M.; PENNA, G. O.; CUNHA, G. Immunopathology of leprosy: the complexity of the mechanisms of host immune response to *Mycobacterium leprae*. **Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, v. 35, n. 4, p. 365-75, Jul-Aug. 2002.

<https://doi.org/10.1590/S0037-86822002000400014>

GOULART, I.M.B. et al. Sorologia e PCR quantitativa na classificação clínica de Ridley-Jopling da hanseníase. In: **Jacy Seixas; Joseanne Cerasoli. (Org.). UFU, ano 30 - tropeçando universos (artes, humanidades, ciências). 1 ed.** p.529-553, 2008.

HARTMANS, S.; DE BONT, J. A. M.; STACKEBRANDT, E. The Genus *Mycobacterium*- Nonmedical. **The Prokaryotes**, v: 3, p.889-918. 2006.

[https://doi.org/10.1007/0-387-30743-5\\_33](https://doi.org/10.1007/0-387-30743-5_33)

HASTINGS, R. C. et al. Leprosy. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 1, n. 3, p. 330-48, Jul. 1988.

<https://doi.org/10.1128/CMR.1.3.330>

HOSSEINI, H. et al. Ordered carbohydrate-derived porous carbons immobilized gold nanoparticles as a new electrode material for electrocatalytical oxidation and determination of nicotinamide adenine dinucleotide. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 59, p. 412-417. Sep. 2014.

<https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.02.046>

HOUBEN, R. M. G. J.; DODD, P. J. The Global Burden of Latent Tuberculosis Infection: A Re-estimation Using Mathematical Modelling. **PLoS Med**, v. 13, n. 10, p. e1002152. Oct. 2016.

<https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002152>

HUNTER, S. W.; FUJIWARA, T.; BRENNAN, P. J. Structure and antigenicity of the major specific glycolipid antigen of Mycobacterium leprae. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 257, n. 24, p. 15072-8, Dec. 1982.

IRGENS, L. M. The discovery of the leprosy bacillus. **Europe PMC**, vol. 122, n. 7, p. 708–709, Mar. 2002.

ISENBERG, H. D. **Clinical microbiology procedures handbook**. 1<sup>a</sup> ed., Washington, DC: American Society for Microbiology, 1992.

JARDIM, M. R. Et al., Criteria for diagnosis of pure neural leprosy. **J Neurol**, v. 250, n. 7, p. 806-9, Jul. 2003.

<https://doi.org/10.1007/s00415-003-1081-5>

JARZEMBOWSKI, J. A.; YOUNG, M. B. Nontuberculous Mycobacterial Infections. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 132, n. 8, p. 1333-1341, Aug. 2008.

JOB, C. K. et al. Transmission of leprosy: a study of skin and nasal secretions of household contacts of leprosy patients using PCR. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 78, n. 3, p. 518-21, Mar. 2008.

<https://doi.org/10.4269/ajtmh.2008.78.518>

KAMAL, A.; KUMAR, N.; BHALLA, V. Rhodamine-dimethyliminocinnamyl based electrochemical sensors for selective detection of iron (II). **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 190, p. 127-133, Jan. 2013.

<https://doi.org/10.1016/j.snb.2013.08.079>

Kang, T. J. et al. Comparison of two different PCR amplification products (the 18-kDa protein gene vs. RLEP repetitive sequence) in the diagnosis of Mycobacterium leprae. **Clin Exp Dermatol**, v. 28, n. 4, p. 420-4, Jul. 2003.

<https://doi.org/10.1046/j.1365-2230.2003.01300.x>

KENNETH, E. et al. **Biomedical Nanostructures**. JohnWiley&Sons, Inc.; Chapter 17, 2010.

KIM, H. J. et al. Differentiation of mycobacterial species by hsp65 duplex PCR followed by duplex-PCR-based restriction analysis and direct sequencing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 11, p. 3855-3862, Nov. 2006.

<https://doi.org/10.1128/JCM.01214-06>

KIM, H.; LEE, D-H.; SON, Y-A. Electrochemical Study on Rhodamine 6G-Indole Based Dye for HOMO and LUMO Energy Levels. **Textile Coloration and Finishing**, v. 25, p. 7-12, Marc. 2013.

<https://doi.org/10.5764/TCF.2013.25.1.7>

KOCH, R. **The etiology of tuberculosis**. In CLENDENING, L. Source Book of Medical history. New York: Dover publications, 1932. p. 392-406.

KOVAL, K. Electrochemically deposited silver detection substrate for surface-enhanced Raman spectroscopy cancer diagnostics. **Journal Biomedicals Optics**, v. 23, n. 7, p. 1-11, Jul. 2018.

<https://doi.org/10.1117/1.JBO.23.7.075002>

LASTORIA, J. C.; ABREU, M. A. M. M. Leprosy: review of the epidemiological, clinical, and etiopathogenic aspects - Part 1. **An. Bras. Dermatol**, v. 89, n. 2, p. 205-218, Apr. 2014.

<https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20142450>

LASTORIA, J. C.; ABREU, M. A. M. M. Leprosy: a review of laboratory and therapeutic aspects - Part 2. **An. Bras. Dermatol.**, v. 89, n. 3, p. 389-401, June 2014b.

<https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20142460>

LEÃO, S. C. et al. 2005. **Practical handbook for the phenotypic and genotypic identification of mycobacteria**. Brugges: Vanden Broelle, 2004. p. 147.

LOBATO, J. et al. Comparison of three immunological tests for leprosy diagnosis and detection of subclinical infection. **Leprosy review**, v. 82, n. 4, p. 389, Dec. 2011.

MADEIRA, S.; ROSA, P. S. **Hanseníase experimental**. Noções de Hansenologia, v. 2, 2000.

MARTINEZ, A.N. et al. Evaluation of real-time and conventional PCR targeting complex 85 genes for detection of Mycobacterium leprae DNA in skin biopsy samples from patients diagnosed with leprosy. **J Clin Microbio**, v. 44, n. 9, p. 3154-9, Sept. 2006.

<https://doi.org/10.1128/JCM.02250-05>

MARTINEZ, T. S. et al. Oral mucosa as a source of Mycobacterium leprae infection and transmission, and implications of bacterial DNA detection and the immunological status. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, p. 1653-1658, Nov. 2011.

<https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03453.x>

MOHANTY, S. P.; KOUZIANOS, E. Biosensors: a tutorial review. **IEEE Potentials**, v. 25, n. 2, p. 35-40, March. 2006.

<https://doi.org/10.1109/MP.2006.1649009>

MOHANTY, K. K. et al. Leprosy reactions: humoral and cellular immune responses to M. leprae, 65kDa, 28kDa, and 18 kDa antigens. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 72, n. 2 p. 149-58, Jun. 2004.

[https://doi.org/10.1489/1544-581X\(2004\)072<0149:LRHACI>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1489/1544-581X(2004)072<0149:LRHACI>2.0.CO;2)

MONOT, M. et al. On the Origin of Leprosy. **Science**, v. 308, n. 5724, p. 1040-1042, May. 2005.

<https://doi.org/10.1126/science/1109759>

MOURA, S. C. et al. Sorologia PGL-I na hanseníase. **Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, v. 41, n. 2, p. 3-5, Feb. 2008.

<https://doi.org/10.1590/S0037-86822008000700002>

NASCIMENTO, V. B.; ANGNES, L. Eletrodos fabricados por "silk-screen". **Química Nova**, v. 21, n. 5, p. 614-629, Feb. 1998.

<https://doi.org/10.1590/S0100-40421998000500014>

NAKAMURA, H.; KARUBE, I. Current research activity in Biosensors, **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 377, n. 3, p. 446-468, Oct. 2003.

<https://doi.org/10.1007/s00216-003-1947-5>

ORSÁGOVÁ, K. Z. et al. Electrochemically deposited silver detection substrate for surface-enhanced Raman spectroscopy cancer diagnostics. **Jounal Biomedical Optics**, v. 23, n. 7, p.1-11. Jul. 2018.

<https://doi.org/10.1117/1.JBO.23.7.075002>

OSKAM, L.; SLIM, E.; BÜHRER-SÉKULA, S. Serology: recent developments, strengths, limitations and prospects: a state of the art overview. **Leprosy Review**, v. 74, n. 3, p. 196-205. Sep. 2003.

PARSONS, L. et al. Laboratory diagnosis of tuberculosis in resource-poor countries: challenges and opportunities. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 2, p. 314-350, Apr. 2011.

<https://doi.org/10.1128/CMR.00059-10>

PATROCINIO, L. G. et al. Detection of *Mycobacterium leprae* in nasal mucosa biopsies by the polymerase chain reaction. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 44, n.3 p. 311–316, Jun. 2005.

<https://doi.org/10.1016/j.femsim.2005.01.002>

PEDLEY, J. C. The presence of *M. leprae* in human milk. **Leprosy Review**, v. 38, p. 239-42. 1967.

<https://doi.org/10.5935/0305-7518.19670040>

PIERSIMONI, C.; SCARPARO, C. Pulmonary infections associated with non-tuberculous mycobacteria in immunocompetent patients. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 8, n. 5, p. 323-334, May. 2008.

[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(08\)70100-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(08)70100-2)

RAFIEE, B.; FAKHARI, A. R. Electrocatalytic oxidation and determination of insulin at nickel oxide nanoparticles-multiwalled carbon nanotube modified screen printed electrode. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 46, p. 130-135, Aug. 2013.

<https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.01.037>

REIS, E. M. et al. *Mycobacterium leprae* DNA in peripheral blood may indicate a bacilli migration route and high-risk for leprosy onset. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 5, p. 447-52, Aug. 2013.

<https://doi.org/10.1111/1469-0691.12349>

REES, R.J.W, YOUNG, D. B. The microbiology of leprosy. In: **Hastings RC, editor Leprosy. 2nd ed.** New York: Churchill Livingstone; 1994. p.49-83.

RICCARDI, C. S. et al. Imunossensor amperométrico. **Química Nova**, v. 25, n. 2, p. 316-320, May. 2002.

<https://doi.org/10.1590/S0100-40422002000200020>

RICHARDS, A. D., RODGERS, A. Synthetic metallomolecules as agents for the control of DNA structure. **Chemical Society Review**, v. 36, n. 3, p. 471-483, 2007.

<https://doi.org/10.1039/B609495C>

RIDLEY, D. S.; JOPLING, W. H. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Disease**, v. 4, n. 3, p. 255-73, Jul. 1966.

ROSA, F. B. et al. Detection of *Mycobacterium leprae* in saliva and the evaluation of oral sensitivity in patients with leprosy. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 5, p. 572-7, Aug. 2013.

<https://doi.org/10.1590/S0074-02762013000500006>

ROSSETTI, M. L. R.; SPERHACKE, R. D. Tuberculose. In: ROSSETTI, M. L.; SILVA, C. M. D.; RODRIGUES, J. J. S. **Doenças Infecciosas: Diagnóstico Molecular**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

RUDEEANEKSIN, J. et al. LightCycler real-time PCR for rapid detection and quantitation of *Mycobacterium leprae* in skin specimens. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 54, n. 2, p. 263-70, Sep. 2008.

<https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2008.00472.x>

SALGADO, C. G. et al. Are leprosy case numbers reliable? **Lancet Infectious Disease**, v. 18, n. 2, p. 135-137, Feb, 2018.

[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30012-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30012-4)

SAMPIETRO, M. et al. Biosensors and molecular imaging. **IEEE Pulse**, v. 2, n. 3, p.35-40, May-Jun. 2011.

<https://doi.org/10.1109/MPUL.2011.941521>

SANTOS, D. F. et al. Molecular, immunological and neurophysiological evaluations for early diagnosis of neural impairment in seropositive leprosy household contacts. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, p. e0006494, May. 2018.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006494>

SANTOS, D. F. et al. Revisiting primary neural leprosy: Clinical, serological, molecular, and neurophysiological aspects. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, p. e0006086, Nov. 2017.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006086>

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**, v. 96, n. 8, p. 1129-33, Nov. 2001.

<https://doi.org/10.1590/S0074-02762001000800017>

SHEPARD, C. C. Temperature Optimum of *Mycobacterium leprae* in Mice. **Journal Bacteriology**, v. 90, n. 5, p.1271-5, Nov 1965.

SILVA, E. A. et al. Utility of measuring serum levels of anti-PGL-I antibody, neopterin and C-reactive protein in monitoring leprosy patients during multi-drug treatment and reactions. **Tropical Medicine and International Health**, v. 12, n. 12, p. 1450-8, Dec. 2007.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2007.01951.x>

SOARES, I. P. et al. Modificação de eletrodos de carbono grafite de baixo custo com ácido 4-hidróxibenzóico para desenvolvimento de biossensor. **Revista Ciências Farmacêutica Básica Aplicada**, v. 38 Supl. 2017.

SURABHI, L. et al. Aptamer-based TB antigen tests for the rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis: Potential utility in screening for tuberculosis. **ACS Infectious Disease**, Just Accepted Manuscript doi: 10.1021/acsinfecdis.8b00201. 2018.

<https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.8b00201>

TALEATAT, Z. et al. Electrochemical immunoassay based on aptamer–protein interaction and functionalized polymer for cancer biomarker detection. **J. Electroanalytical Chemistry**, v. 15, p. 119–124, Mar. 2014.

<https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2014.01.015>

TIMPE, A.; RUNYON, E. H. The relationship of “atypical” acid-fast bacteria to human disease: a preliminary report. **J Lab Clin Med**. St. Louis, v. 44, p. 202, 1954.

TRAN, M. et al. Utilization of Inexpensive Carbon-Based Substrates as Platforms for Sensing. **Sensors (Basel)**, v. 18, n. 8, p. 2444, Jul. 2018.

<https://doi.org/10.3390/s18082444>

TRÉVENOT, D. R. et al. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. **Biosensor & Bioelectronics**, v. 16, p. 121-131, Jan. 2001.

[https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(01\)00115-4](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(01)00115-4)

TRINDADE, M. A. B, NEMES, M.I.B. Incapacidades físicas em hanseníase no momento do diagnóstico: características epidemiológicas dos casos registrados de 1983 a 1988 no Estado de São Paulo. **Hansenologia Internationalis**, v.17, p. 8-14, 1992.

TRUMAN, R. W. et al. Enumeration of *Mycobacterium leprae* using real-time PCR. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v. 2, n. 11, p. e328, Nov, 2008.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000328>

TRUMAN, R. et al. Genotypic variation and stability of four variable-number tandem repeats and their suitability for discriminating strains of *Mycobacterium leprae*. **J Clin Microbiol**, v. 42, n. 6, p. 2558-65, Jun 2004.

<https://doi.org/10.1128/JCM.42.6.2558-2565.2004>

TRUMAN, R. W. et al. Probable zoonotic leprosy in the southern United States. **The New England Journal of Medicine**, v. 364, n. 17, p. 1626-1633, Apr. 2011.

<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1010536>

TSUKAMURA, M. **Identification of mycobacteria**. Obu, Aichi: The National chubu Hospital; 1984.

TURANKAR, R. P. et al. Comparative evaluation of PCR amplification of RLEP, 16S rRNA, rpoT and SodA gene targets for detection of *M. leprae* DNA from clinical and environmental samples. **International Journal Mycobacteriology**, v. 4, n.1, p. 54-59, Mar. 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.ijmyco.2014.11.062>

VAN BEERS, S. M.; DE WIT, M. Y.; KLATSER, P. R. The epidemiology of *Mycobacterium leprae*: recent insight. **FEMS Microbiology Letters**, v. 136, n. 3, p. 221-30, Mar. 1996.

<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1996.tb08053.x>

VERMA, V. K. et al. Convenient and ultra-sensitive fluorescence detection of bovine serum albumin by using Rhodamine-6G modified gold nanoparticles in biological samples. **Luminescence**, v. 33, n. 8, p. 1408-1414. Oct. 2018.

<https://doi.org/10.1002/bio.3563>

WAYNE, L. G., RUNYON, E. H., KUBICA, G. P. *Mycobacteria: A guide to nomenclatural usage*. **Am Rev Resp Dis**. Baltimore, v. 119, p. 107-159, 1969.

WANG, J. Decentralized electrochemical monitoring of trace-metals-from disposable strips to remote electrodes – plenary lecture. **Analyst**, v. 119, n. 5, p. 763- 766, May, 1994.

<https://doi.org/10.1039/an9941900763>

WANG, Z. et al. Electrochemical determination of lead and cadmium in rice by a disposable bismuth/electrochemically reduced grapheme/ ionic liquid composite modified screen-printed electrode. **Sensors and Actuators B**, v. 199, p. 7-14, Aug. 2014.

<https://doi.org/10.1016/j.snb.2014.03.092>

WATERS, W. R. et al. Interleukin-17A as a biomarker for bovine tuberculosis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 23, p. 168-180, Dec. 2016.

<https://doi.org/10.1128/CVI.00637-15>

WOLINSKY, E. State of the art: nontuberculous mycobacteria and associated diseases. **Am J Respir. Crit Care Med**. New York, v. 119, p. 107-159, 1979.

WHO. World Health Organization. **Global Leprosy Strategy 2016–2020**. Accelerating towards a leprosy-free world. Geneva, 2016.

WHO. World Health Organization. **Global Tuberculosis Report**. 2017.

WHO. World Health Organization. **Latent tuberculosis infection: Updated and consolidated guidelines for programmatic management**. Geneva: World Health Organization; 2018.

WHO. World Health Organization. Weekly epidemiological record. **Global leprosy update, 2017: reducing the disease burden due to leprosy**, v. 93, p. 445-456, Aug. 2018b).

YOUNG, L. S. et al. Mycobacterial infections in AIDS patients, with an emphasis on the *M. avium* complex. **Rev Infect Dis**. Chicago, v. 8, p. 1024-1033, 1986.  
<https://doi.org/10.1093/clinids/8.6.1024>

# Capítulo II

## Artigo 1:

**ELETRODOS *SCREEN-PRINTED* DE GRAFITE FUNCIONALIZADOS COM  
RODAMINA 6G PARA DETECÇÃO DE MYCOBACTERIUM *SP* EM  
IMUNOSSENSOR ELETROQUÍMICO**

Versão em português do artigo que será submetido à revista Biosensors and Bioelectronics. Fator de impacto: 8,173.

## **ELETRODOS *SCREEN-PRINTED* DE GRAFITE FUNCIONALIZADOS COM RODAMINA 6G PARA DETECÇÃO DE MYCOBACTERIUM SP EM IMUNOSSENSOR ELETROQUÍMICO**

Fabiane Nunes Riello<sup>1\*</sup>, Ana Flávia Oliveira Notário<sup>1</sup>, Isabela Maria Bernardes Goulart<sup>2</sup>, Luiz Ricardo Goulart<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Nanotecnologia, Universidade Federal de Uberlândia, Campus Umuarama Bloco 2E Sala 248, CEP 38402-022, Uberlândia – MG, Brasil;

<sup>2</sup> Centro de Referência Nacional em Dermatologia Sanitária e Hanseníase, Universidade Federal de Uberlândia, Rua Capricórnio, 94 - Jardim Brasília, CEP 38401-404, Uberlândia – MG, Brasil;

Autores correspondentes: Luiz Ricardo Goulart, E-mail: [lr\\_goulart@gmail.com](mailto:lr_goulart@gmail.com) e Fabiane Nunes Riello, E-mail: [fabiriello@yahoo.com.br](mailto:fabiriello@yahoo.com.br), [flavia.notario@hotmail.com](mailto:flavia.notario@hotmail.com); [imbgoulart@gmail.com](mailto:imbgoulart@gmail.com)

### **2.1 - Resumo**

Métodos que envolvem a detecção eletroquímica têm mostrado novas possibilidades para o diagnóstico de várias doenças devido à capacidade de reconhecer moléculas biológicas específicas. Mas, apresentam limitações como a falta de padronização da área de trabalho e a dificuldade de aderência de algumas biomoléculas à superfície sensorial de eletrodos descartáveis. Buscando novos meios de funcionalização da superfície dos eletrodos para imobilização e reconhecimento de biomoléculas de forma eficiente e com menor custo, utilizou-se a rodamina 6G adsorvida em eletrodos *screen-printed* de grafite. Amostras de micobactérias foram utilizadas como modelo experimental devido a procura por novas técnicas de diagnóstico para doenças infecciosas. O anticorpo específico foi imobilizado na superfície dos eletrodos funcionalizados e amostras de micobactérias foram detectadas através de medidas de voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial em potenciostato portátil. A funcionalização com rodamina 6G permitiu maior estabilidade da área de trabalho dos eletrodos, melhorou a resposta e auxiliou na retenção de biomoléculas comparado a eletrodos virgens. Das treze amostras de cultura de TB testadas, todas tiveram detecção específica ( $\Delta i > 60 \mu A$ ) e foram diferenciadas de outras espécies de

micobactérias (exceto *M. avium*). O biossensor desenvolvido apresentou facilidade de manuseio, rapidez, baixo custo, especificidade, reprodutibilidade, estabilidade e tem grande potencial para ser utilizado na detecção, reconhecimento e diagnóstico de biomoléculas que possuam carboidratos na sua estrutura.

## 2.2 - Introdução

Um biossensor é definido como um aparelho analítico compacto que converte uma resposta do elemento biológico imobilizado na superfície do sensor num sinal elétrico mensurável (Chen et al. 2012). Os biossensores eletroquímicos vem sendo utilizados nas mais diversas aplicações podendo estar presente em campos como saúde humana, veterinária, agricultura, indústria alimentícia, indústria farmacêutica, meio ambiente, defesa da população civil, controle de infecção hospitalar entre outras por apresentarem características que os tornam uma ferramenta cada vez atrativa. Por possuírem a capacidade de reconhecer moléculas biológicas específicas, tem o tornado tão divulgados e aplicados em diagnóstico clínico (Hosseini et al. 2014; Trévenot et al. 2001).

Os eletrodos impressos por sistema de serigrafia são chamados de SPCE (*Screen-Printed Carbon Electrode*) ou *silk-screen* e são empregados com grande sucesso por possibilitar a produção em massa com custo baixo, simplicidade de utilização, sensibilidade e seletividade para determinadas detecções, precisão e respostas rápidas e sem algumas limitações apresentadas pelos eletrodos sólidos (Nascimento, Angnes 1998). Possuem ainda a vantagem de serem descartáveis, além da facilidade de miniaturização, pois pelo seu formato planar e o sistema integrado de três eletrodos - eletrodo de trabalho (ET); referência (ER) e contra eletrodo (CE), propiciam a sua integração a pequenos dispositivos portáteis (Mohanty, Koungianos 2006). Mas apresentam limitações, como a falta de padronização da área de trabalho, a dificuldade de aderência de algumas biomoléculas a superfície sensorial e a ausência de eletrodos comerciais funcionalizados baseados nessa tecnologia.

Porém, a versatilidade dos eletrodos possibilita a combinação com reagentes específicos, com objetivo de modificar sua superfície, controlando as reações físico-química que ocorrem na interface, propiciando maior reatividade e seletividade ampliando significativamente as suas aplicações (Cerrato-Alvarez et al. 2018). Desta forma, a utilização de eletrodos quimicamente funcionalizados é uma área em franca

expansão, principalmente no aspecto do desenvolvimento de novos materiais e novos métodos de modificação de superfície de eletrodos.

O uso de camadas de agentes funcionalizadores sobre a superfície do eletrodo tem sido a forma mais comum de funcionalizar a superfície de um eletrodo (Castillo et al. 2013). Existem na literatura eletrodos funcionalizados das mais diversas formas como imobilização de grupos funcionais, incorporação de catalisadores inorgânicos e biológicos, utilização de filmes poliméricos, matrizes inorgânicas, de membranas biológicas, incorporação de aditivos e uso de nanomateriais como nanopartículas de carbono e metálicas ou nanotubos (Pereira et al. 2002).

Buscando novos meios de funcionalização da superfície dos eletrodos para estabilizar e amplificar a resposta eletroquímica de forma eficiente e com menor custo, investigou-se a utilização da rodamina 6G como indicador e funcionalizador eletroquímico.

As rodaminas, são uma família de químicos orgânicos usados como corantes, conhecidas como fluoronas, é um composto catiônico fluorescente de fórmula  $C_{28}H_{31}N_2O_3Cl$ . Esses corantes têm sido muito utilizados como agentes de rastreamento em estudos de água, poluição e pulverização de pesticidas aéreos e como coloração drogas, cosméticos, têxteis e tintas. Estes compostos são muito utilizados em aplicações biotecnológicas, como microscopia de fluorescência, citometria de fluxo, espectroscopia de fluorescência e ELISA (Georges et al. 1996; Verma et al. 2018).

Normalmente corantes catiônicos deste tipo são usados em lasers e como moléculas de prova em diversas aplicações biológicas, principalmente por causa de sua baixa toxicidade, eficiência quântica, pequena dependência de fatores ambientais, e suas características fluorescentes não se alterarem ao longo de várias horas, se sua solução aquosa for continuamente agitada (Kim et al. 2013).

Compostos que possuam anéis aromáticos, assim como a rodamina, podem ser usados como indicadores eletroquímicos por interagirem com DNA através de ligação eletrostática ou de fusão (Richards, Rodgers 2007). Nas análises eletroquímicas a rodamina é utilizada na detecção de íons metálicos (Kamal et al. 2013), e é bastante usada em espectroscopia de Ramam, como modelo de analito para testar superfícies modificadas (Orságová et al. 2018; Tran et al. 2018).

A rodamina 6G é uma interessante molécula de aplicação tecnológica por apresentar, assim como a tetrametilbenzidina, anéis aromáticos e estrutura com

afinidade a moléculas biológicas (Alves-Balvedi et.al. 2016), o que torna a superfície biocompatível a elementos como antígenos e anticorpos, podendo ser utilizada como um funcionalizador promissor no preparo de técnicas de sensoriamento biológico e diagnóstico de doenças. Ainda não foram encontradas utilizações do corante rodamina como indicador ou funcionalizador em biossensores eletroquímicos.

As micobactérias pertencem ao gênero *Mycobacterium*, família *Mycobacteriaceae*. São descritas mais de 190 espécies e 14 sub-espécies (Euzéby, 2019). As espécies patogênicas mais importantes para o homem são as do complexo *Mycobacterium tuberculosis* e o *Mycobacterium leprae*. Organismos como os do *Mycobacterium avium-intracellulare* são oportunistas e infectam pacientes imunossuprimidos (Waters et al. 2016). Existem também outras espécies, as atípicas ou micobactérias não tuberculosas que são na maioria saprófitas de vida livre e são menos associadas a doenças (Jarzembowski, Young 2008).

A tuberculose (TB) é uma doença altamente infecciosa que está associada a uma morbidade e mortalidade significativas no mundo, com 10,4 milhões de novos casos estimados de TB e mais de 1,4 milhões mortes em 2016 (WHO 2017). A detecção e tratamento precoces são os meios mais eficazes de interromper a transmissão da doença. Porém, carecem de abordagens alternativas de diagnóstico que reduzam o tempo de resposta e mantem sensibilidade e especificidade aceitáveis, diminuindo custos, dependência de infraestrutura e mão de obra especializados (Surabhi et al. 2018).

Métodos que envolvem a detecção eletroquímica têm mostrado novas possibilidades para o diagnóstico de várias doenças. Devido a procura por novas técnicas de diagnóstico para doenças infecciosas como as causadas por micobactérias utilizou-se esses patógenos como modelo experimental para testar a funcionalização dos eletrodos com rodamina 6G. Cabe ressaltar que esta aplicação serve como exemplo da viabilidade de seu uso, não sendo exclusivamente para este fim e poderá ser utilizado em diagnóstico de outras doenças e/ou reconhecimento de biomoléculas que possuam carboidratos na sua estrutura, utilizando antígenos, anticorpos, peptídeos, enzimas, DNA, RNA e aptâmeros.

Este trabalho apresenta o desenvolvimento de um novo método de biossensoriamento que permite a estabilização e funcionalização da superfície de eletrodos *screen-printed* de grafite mediante a aplicação de Rodamina 6G como

modificador da superfície de trabalho de eletrodos, como prova de conceito em amostras de micobacérias.

## 2.3– Materiais e Métodos

### Reagentes

O anticorpo monoclonal anti-*M. tuberculosis* LAM (NR-13811) foi adquirido pela BEI resources (Manassas, VA, USA). A rodamina 6G foi adquirida da Sigma-Aldrich Chemical Co (989-38-8). Todos os outros reagentes eram de grau analítico e usado sem purificação adicional. A solução eletrolítica continha concentrações iguais de ambas as formas oxidadas e reduzidas do par redox  $K_4Fe(CN)_6 / K_3Fe(CN)_6$  ferrocianeto de potássio e ferricianeto de potássio 5mM em KCl 0,1M. As amostras de cultura de *mycobacterium sp.* foram cedidas pelo Laboratório de Análises Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), diluídos em solução tampão contendo 1M de TRIS, 0,5M de EDTA e 5M de NaCl. Todas as soluções aquosas foram preparadas usando água ultrapura (Milli-Q, Millipore).

### Aparatos

O eletrodo utilizado foi do tipo *screen-printed* (DropSens), com um eletrodo de trabalho de grafite (4 mm de diâmetro), contra eletrodo de grafite e eletrodo de referência de prata/cloreto de prata (Ag/AgCl). (Ref. DRP 110). Adsorção eletroquímica e medidas voltamétricas foram realizados utilizando um potenciostato portátil PalmSens 3 (Compact Electrochemical Interfaces). As leituras foram feitas com software PStace. Para Microscopia eletrônica de varredura o equipamento Vegan3 Tescan foi utilizado.

### Funcionalização da superfície com rodamina 6G

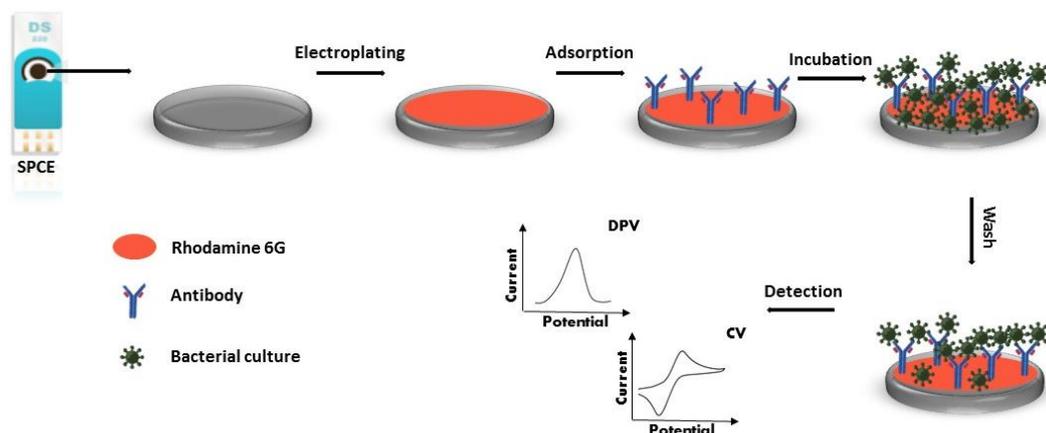
A solução de rodamina 6G foi preparada em concentrações de 100ug a 100mg e armazenada a -4°C fora da luz. Os eletrodos *screen-printed* foram previamente lavados com água ultrapura e secos em temperatura ambiente. As soluções de rodamina 6G foram adicionadas (testados em diferentes concentrações), espalhados por toda superfície da área de trabalho, e após a adsorção total cerca de 20 min, foi realizada a eletrodeposição conectando o eletrodo ao receptor do potenciostato, e executada três vareduras consecutivas em voltametria cíclica, 0,2 V/s, de -0,3 a 0,8V,

utilizando 80 $\mu$ L de ferroferricianeto de potássio como eletrólito suporte. Após esse processo os eletrodos foram novamente lavados como anteriormente e armazenados a temperatura ambiente até o uso.

### Uso do eletrodo funcionalizado

Em eletrodos SPCEs funcionalizados com rodamina 6G foram aplicados na superfície de trabalho o anticorpo anti-*M. tuberculosis* LAM (0,5 $\mu$ g/ $\mu$ L) e incubados a temperatura ambiente por alguns minutos. Treze amostras aleatórias de cultura de pacientes diferentes com tuberculose e amostras de cultura de outras micobactérias comprovadas por PCR-RFLP (Riello et al. 2015) foram adicionadas nesses eletrodos e, após incubação, foram lavados com água ultra-pura. A detecção foi confirmada por voltametria de pulso diferencial entre -0,5 V a 0,5 V, com um incremento de 20mV, modulação de amplitude de 300mV, um intervalo de pulso de 0,06s e taxa de varredura de 0,1V/s. Medidas de voltametria cíclica -0,3V a 0,8V, com um potencial de 20mV e taxa de varredura de 0,2V/s em potenciostato portátil utilizando o ferroferricianeto de potássio como eletrólito suporte (**Esquema 1**).

Teste com antígenos de *M. leprae* também foram realizados afim de comprovar a utilização em outras micobactérias. Com eletrodos modificados da mesma forma adicionou-se o antígeno PGL-I (0,5 $\mu$ g/ $\mu$ l) e em seguida o anticorpo específico anti-PGL-1 foi juntamente adsorvido, após incubação os eletrodos foram lavados e as medidas foram realizadas como descrito acima.

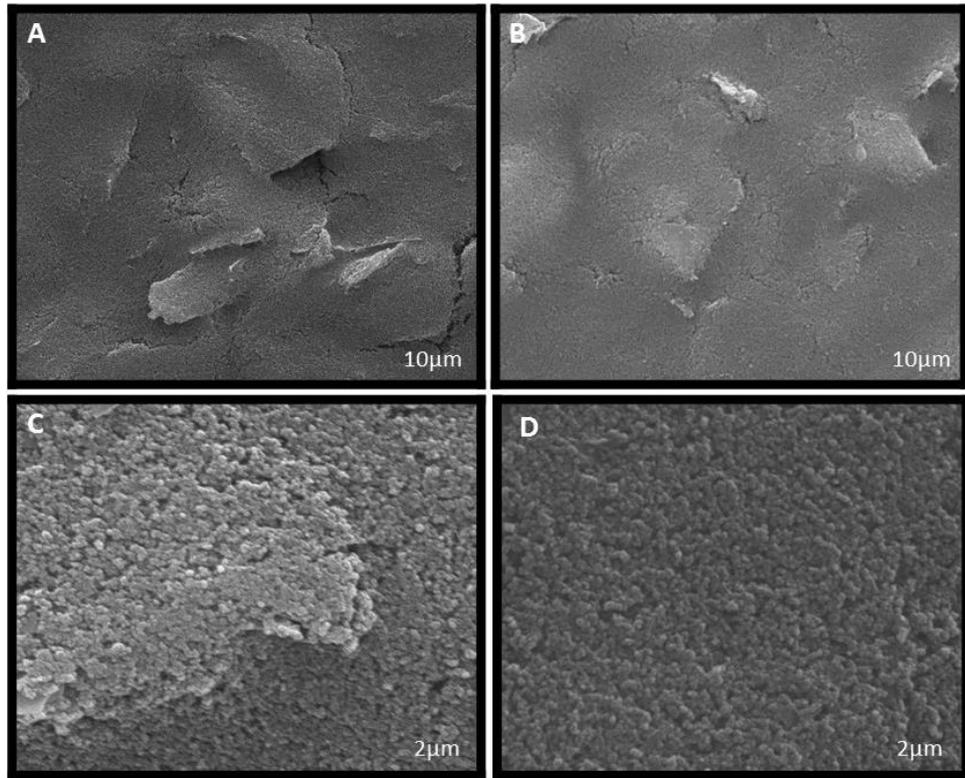


**Esquema 1.** Funcionalização do SPCE com rodamina 6G seguido da adsorção de um anticorpo específico para detecção de micobactérias.

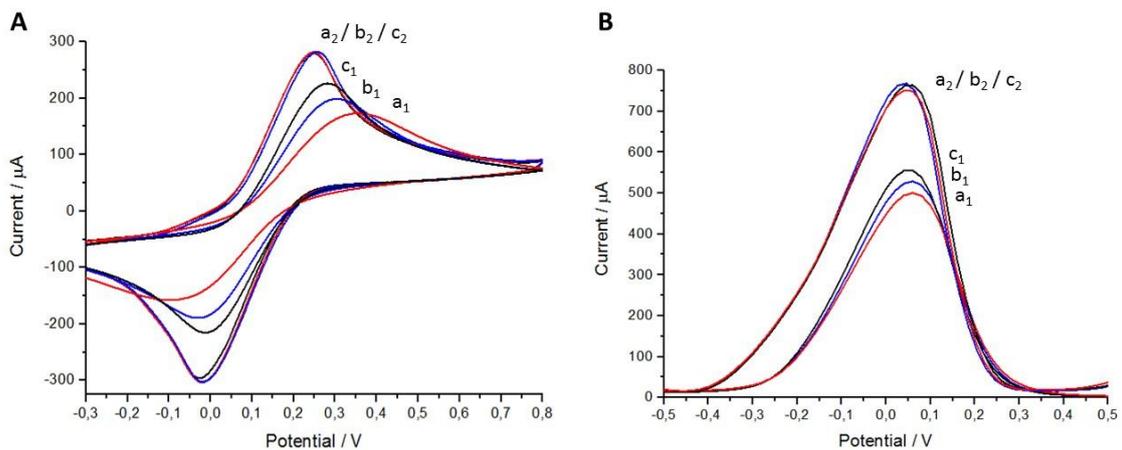
## 2.4 - Resultados e discussões

### Caracterização do processo de funcionalização

A morfologia da superfície do eletrodo é um fator que pode afetar o desempenho do imunossensor. A **Fig. 1** mostra imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) do eletrodo de trabalho do SPCE virgem e funcionalizado com rodamina 6G. Nas **figuras 1(A)** e **(C)** tanto no aumento de 10 $\mu$ m como no de 2 $\mu$ m nota-se uma superfície mais heterogênea devido a porosidade do eletrodo de grafite, o que interfere diretamente na adsorção desigual dos compostos. Enquanto nas **figuras 1(B)** e **(D)** eletrodo funcionalizado com rodamina 6G mostraram uma superfície mais homogênea, menos porosa, formando um filme liso. As reações de oxirreduções ocorreram de forma igual quando adicionados a mesma solução eletrolítica como é possível observar na (**Fig. 2**), que ilustra a varredura de voltametria cíclica (VC) (**fig. 2(A)**) e voltametria de pulso diferencial (VPD) (**fig. 2(B)**) para três eletrodos diferentes antes da funcionalização ( $a_1$ ,  $b_1$  e  $c_1$ ), e os mesmos eletrodos após a adsorção de rodamina 6G ( $a_2$ ,  $b_2$  e  $c_2$ ). Observa-se que nas voltametrias dos eletrodos virgens ocorreu uma grande variação, mais de 50 $\mu$ A, na amplitude do pico de oxidação da VPD e da VC e nesta o potencial de oxidação também variou de 0,2 a 0,4V. Enquanto os eletrodos funcionalizados com rodamina 6G além de aumentar significativamente os picos das correntes em até 61% na VC e até 64% na VPD em comparação a eletrodos virgens, indicando maior passagem de elétrons devido ao comportamento catiônico da rodamina em relação ao par redox  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-} / [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ , as correntes de oxidação desses eletrodos funcionalizados tiveram um pequeno desvio padrão (1,5 na VC e 12,4 na VPD) em relação ao desvio padrão obtido nas correntes de oxidação de eletrodos virgens (25,4 na VC e 28 na VPD). A rodamina 6G tem uma adsorção eficiente no carbono, possivelmente devido a interações de *Van der Waals* entre os anéis aromáticos e a superfície do eletrodo. Provando assim que essa funcionalização foi útil para homogeneizar, padronizar e aumentar a condutividade da superfície transdutora dos eletrodos preparando-os assim para imobilização de sondas. Isso ocorre por que o filme de rodamina (catiônica) parece catalisar a transferência eletrônica da sonda na presença de ferro/ferri (aniônica). Os grupos funcionais ou substitutos periféricos na rodamina também ajudam na retenção das sondas evitando a lixiviação durante o processo de lavagem.



**Figura 1.** Imagens do MEV do SPCE de grafite (A e C) eletrodo sem modificação; (B e D) eletrodo modificado com rodamina 6G.

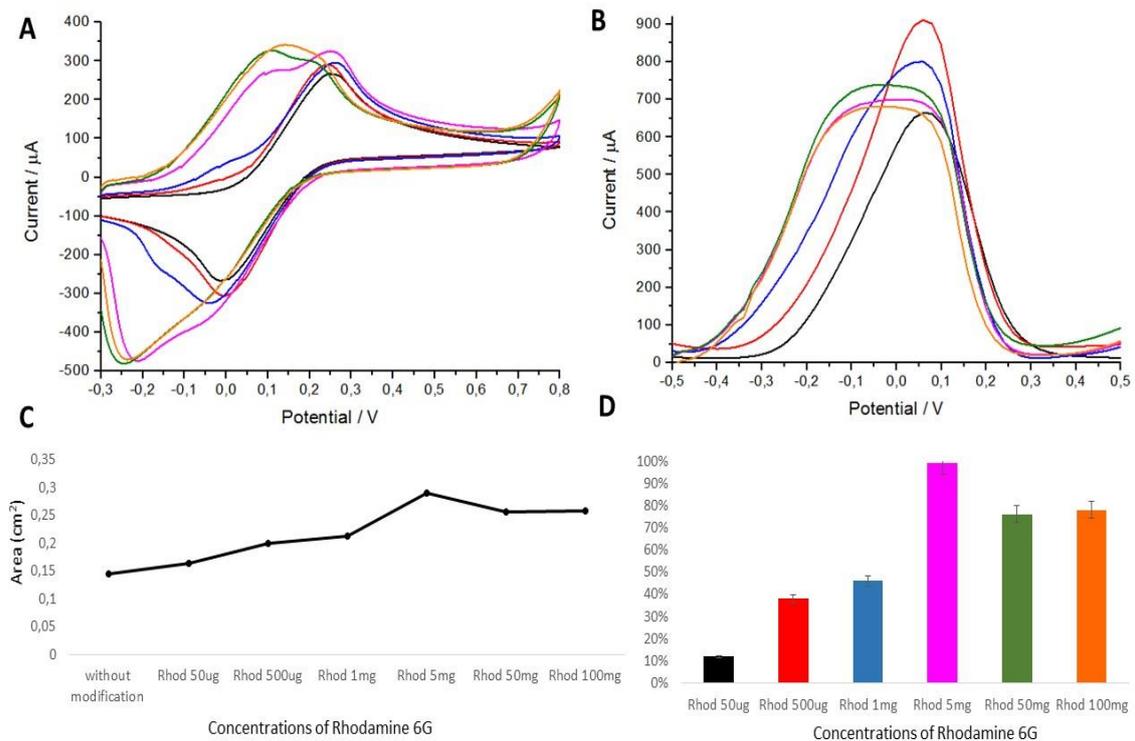


**Figura 2.** (A) VC: Potencial 20mV e Taxa de varredura 0,2V/s; (B) DPV: Modulação da amplitude:300mV; Intervalo de pulso:0.6s; taxa de varredura de 0,1V/s; (a<sub>1</sub>, b<sub>1</sub> e c<sub>1</sub>)

eletrodos sem modificação, ( $a_2$ ,  $b_2$  e  $c_2$ ) eletrodos modificados com rodamina 6G em eletrólito suporte:  $K_4Fe(CN)_6$  /  $K_3Fe(CN)_6$  5mM/ KCl 0,1M.

### Otimização da concentração de rodamina 6G e velocidades de varredura

A adsorção de diferentes concentrações de rodamina 6G para funcionalização da superfície dos eletrodos foi investigada a fim de estudar sua interação com o grafite para escolha da melhor diluição a ser utilizada. Analisando as medidas de VC (**Fig. 3(A)**), observamos que conforme a concentração de rodamina aumenta, a corrente de oxidação e redução também aumentaram, porém, o perfil das curvas voltamétricas são deslocados para potenciais menos anódicos e mais catódicos e os picos ficaram mais espaçados a partir da concentração de 1mg, até 1mg ( $\Delta E=0 - 0,25V$  /  $\Delta i= -250 - 250\mu A$ ),  $>1mg$  ( $\Delta E= -0,25 - 0,1V$  /  $\Delta i= -450 - 350 \mu A$ ), provavelmente pela saturação da rodamina na superfície desses eletrodos. Na VPD (**Fig. 3(B)**) o pico de oxidação decresce com concentrações acima de 500 $\mu g$  novamente comprovando que essa é a concentração limite para modificar de forma eficiente os eletrodos e concentrações acima dessa margem saturam a superfície transdutora dificultando a ligação das sondas e dos alvos. A **Fig. 3(C)** apresenta os valores da área ativa dos eletrodos após a adsorção de concentrações de rodamina na superfície calculado pela velocidade de varredura dos picos das correntes de oxidação em voltametria cíclica e formulados na equação de *Randles-Sevcik* (Fatimah el al. 2017). Na **Fig. 3(D)** podemos observar que houve um aumento de até 99% (rodamina 5mg) na área ativa dos eletrodos funcionalizados em relação ao eletrodo virgem. Como a rodamina também age como mediador, apesar da área eletroativa diminuir com concentrações acima de 5mg, a transferência de elétrons continua aumentando.



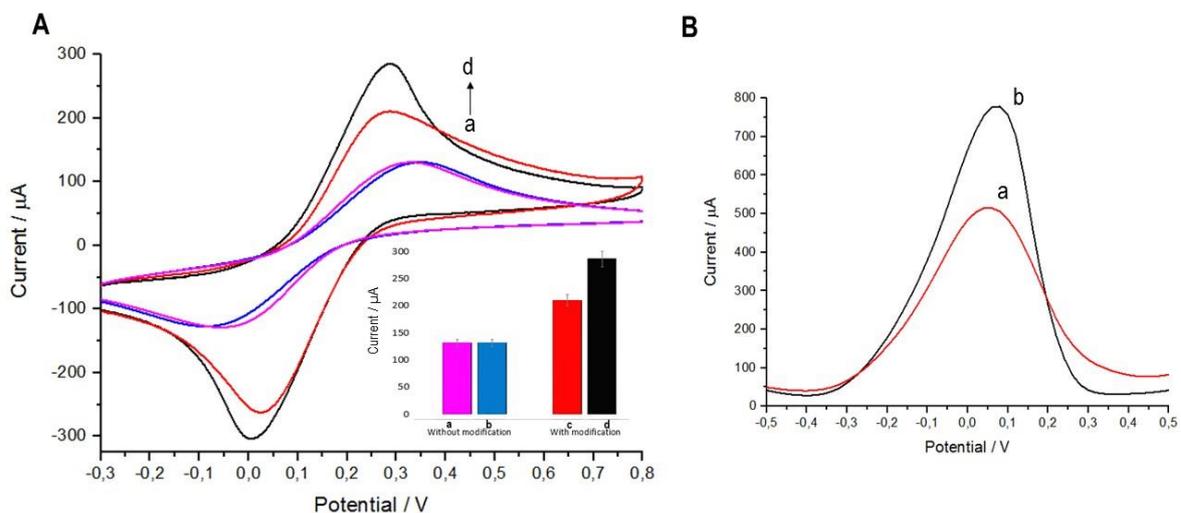
**Figura 3.** Estudo das diferentes concentrações de rodamina 6G. Linha preta: 50 $\mu\text{g}$ , linha vermelha: 500 $\mu\text{g}$ , linha azul: 1mg, linha rosa: 5mg, linha verde: 50mg e linha laranja: 100mg. (A) VC: Potencial 20mV e Taxa de varredura 0,2V/s; (B) VPD: Modulação da amplitude: 300mV; Intervalo de pulso: 0.6s; Taxa de varredura de 0,1V/s; eletrólito suporte:  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 / \text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  5mM/ KCl 0,1M. (C) Área ativa dos eletrodos modificados calculada pela equação de Randles-Sevcik. (D) Porcentagem do aumento da área ativa de eletrodos modificados comparados com eletrodo sem modificação.

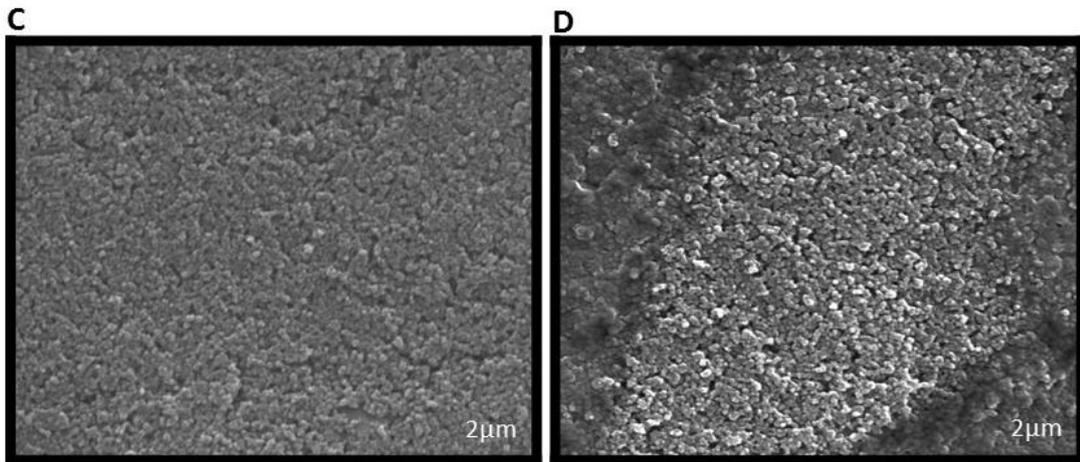
### Detecção de amostras de micobactérias no biossensor

Para comprovar a eficiência da funcionalização e suas vantagens no auxílio da imobilização de amostras biológicas utilizou-se como exemplo o anti-*M.tuberculosis* LAM como sonda para detecção do alvo presente em amostras de cultura de pacientes com tuberculose e foram realizados testes comparativos em eletrodos funcionalizados e sem funcionalização (**Fig. 4(A)**). Observa-se uma diferença significativa de aproximadamente 100  $\mu\text{A}$  entre os picos das correntes de oxidação do controle positivo e o branco nos eletrodos modificados na VC, enquanto essa redução não ocorre nos eletrodos não funcionalizados, indicando que a adsorção do anticorpo

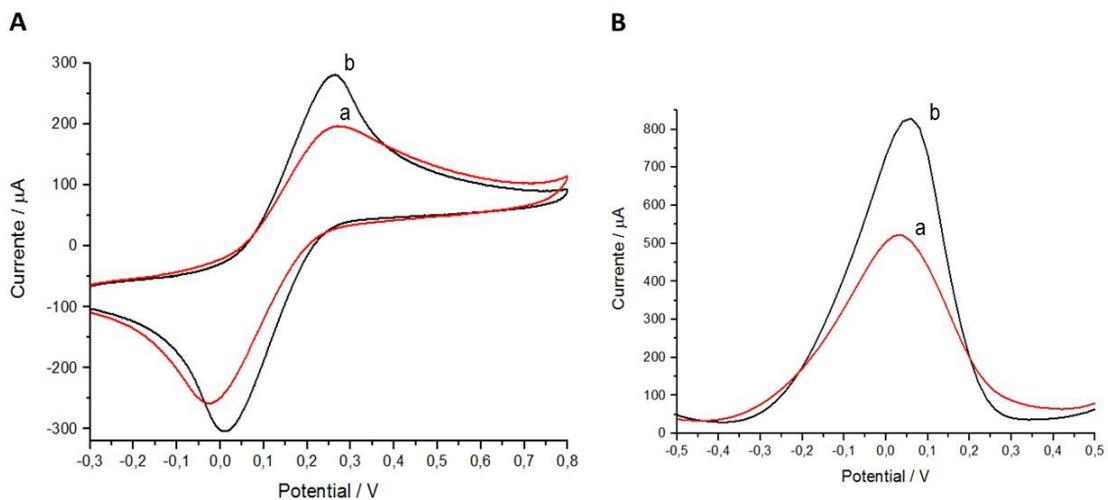
nesses eletrodos é ineficiente, pois após a lavagem com água, as biomoléculas são lixiviadas. Para a detecção com alguns anticorpos é necessária modificação na superfície dos SPCEs assim como foi descrito por (Díaz-González et al. 2005; Ho et al. 2010; Vural et al. 2018). Uma diferença de aproximadamente 280 $\mu$ A entre as correntes de oxidação nas amostras também pode ser observada em VPD nos eletrodos funcionalizados (**Fig. 4(B)**). A **Fig. 4(C)** mostra um eletrodo funcionalizado com rodamina 6G e com anticorpo imobilizado na superfície de trabalho. Já a **figura 4(D)** mostra as imagens do MEV após a adição das amostras de cultura de micobactérias nos eletrodos funcionalizados com rodamina e anticorpo imobilizado, ou seja, após o acoplamento biológico e lavagens abundantes em água. Essa microscopia corrobora visualmente que houve modificação intensa na superfície do eletrodo após a adição da amostra devido ao reconhecimento biológico.

No teste com antígenos de *M. leprae* houve o reconhecimento específico de forma semelhante ao que ocorre nas análises com antígeno de *M. tuberculosis* (**Fig. 5 (A) e (B)**).





**Figura 4.** (A) VC em SPCE de grafite não funcionalizados (a e b), e em eletrodos funcionalizados com rodamina 6G (c e d). (B) VPD em eletrodo funcionalizado (a e c): eletrodos incubados com anti-LAM e amostra de *M. tuberculosis* (controle positivo). (b e d) incubados somente com anti-LAM (branco). (C) Imagens de MEV de SPCE de grafite modificados com rodamina 6G e anti-LAM. (D) modificados com rodamina 6G, anti-LAM e cultura de *M. tuberculosis*.



**Figura 5.** (A) VC: Potencial 20mV e Taxa de varredura 0,2V/s; (B) DPV: Modulação amplitude: 300mV; Intervalo de pulso: 0,6s; Taxa de varredura de 0,1V/s; eletrólito suporte:  $K_4Fe(CN)_6 / K_3Fe(CN)_6$  5mM/ KCl 0,1M. (a) SPCE de grafite incubados com

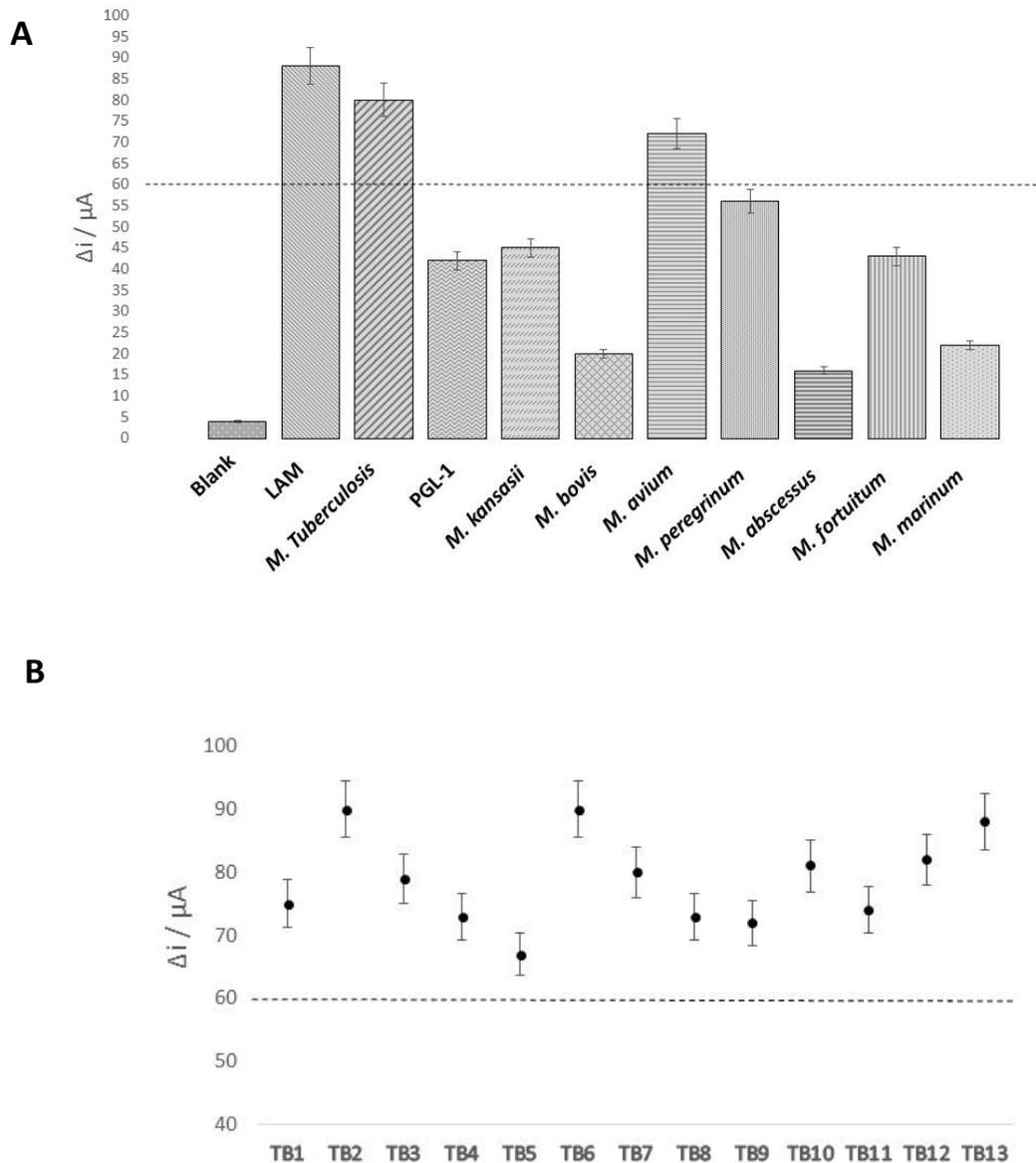
*PGL-I* (antígeno específico de *M. leprae*) e anti-*PGL-1* (controle positivo), (b) incubado somente com *PGL-I* (branco).

### **Especificidade, reprodutibilidade e estabilidade**

O antígeno LAM sintético, *PGL-I* e amostras de cultura de outras micobactérias foram utilizadas para testar a especificidade do teste, antígenos não específicos e outras espécies de micobactérias (exceto *M. avium*) não tiveram detecção específica para o anti-LAM ( $\Delta i < 60 \mu A$ ) (**Fig. 6(A)**). O *M. avium* foi a única espécie que apresentou reconhecimento com o anticorpo anti-LAM de *M. tuberculosis*. Por se tratar de uma espécie com sintomatologia clínica proximamente ligada ao *M. tuberculosis* a diferenciação entre as duas espécies é recomendada, especialmente em paciente imunocompetentes. Atualmente a diferenciação entre as duas espécies é feita pela característica das culturas e/ou técnicas moleculares (Kellogg et al. 2001, Telenti et al., 1993, Riello et. al. 2016) o que demanda tempo e mão de obra especializada. O modelo de biossensor eletroquímico apresentado neste trabalho poderá ser capaz de diferenciar a qualquer espécie de micobactéria, desde que o elemento alvo seja um anticorpo específico a espécie a qual deseja reconhecimento, diminuindo tempo, custo e simplificando a técnica de diagnóstico. Outra vantagem do biossensor eletroquímico foi a capacidade de diferenciar espécies pertencentes ao complexo *M. tuberculosis* (CMTB) como *M. bovis* de *M. tuberculosis* já que outros métodos descritos não foram capazes de fazer essa diferenciação (Chimara et al. 2008, Wu et al. 2009, Kim et al. 2010, Ngan et al. 2011, Scherer et al. 2011).

Nas treze amostras de cultura de pacientes com TB testadas, todas tiveram detecção específica ( $\Delta i > 60 \mu A$ ), reproduzindo o teste de forma fidedigna (**Fig. 6(B)**).

O biossensor construído foi armazenado a  $-4^{\circ}C$  por 60 dias e realizadas leituras em VC com amostra de *M. tuberculosis*: a diferença entre o biossensor na presença do controle positivo e o biossensor com controle negativo foi maior que  $70 \mu A$ , evidenciando a estabilidade da ligação do anticorpo com a rodamina depositada no eletrodo.



**Figura 6.** (A) Reconhecimento específico: antígenos e amostras de micobactérias, Todos os eletrodos foram preparados com anti-LAM. Branco: eletrodo somente com anti-LAM. (B) Reprodutibilidade: amostras de cultura de pacientes com TB.  $\Delta i$  = diferença do pico de oxidação na VC da linha base (eletrodo preparado apenas com rodamina 6G) com pico de oxidação das outras amostras.

## 2.5- Conclusão

Este trabalho demonstrou que a funcionalização e estabilização da área de trabalho de eletrodos *screen-printed* de grafite mediante a aplicação de Rodamina 6G

foi eficiente no reconhecimento de biomoléculas que possuam carboidratos na sua estrutura como demonstrado em amostras de micobactérias.

O biossensor desenvolvido foi capaz de detectar bactérias em amostras de pacientes com tuberculose e diferenciar *M. tuberculosis* das principais outras espécies do gênero. O *M. avium* foi a única espécie que obteve o mesmo reconhecimento, porém pode ser diferenciada com um sensor usando anticorpo específico para a captura da mesma. Dessa forma, podemos criar sensores utilizando antígenos, anticorpos, peptídeos, enzimas, DNA, RNA e aptâmeros para o diagnóstico e/ou reconhecimento de outras micobactérias ou outras doenças.

O biossensor tem vantagens como baixo custo, simplicidade na preparação e imobilização, portabilidade, especificidade, reprodutibilidade, estabilidade, resposta rápida e tem grande potencial para ser largamente utilizado na detecção, reconhecimento e diagnóstico de quaisquer biomoléculas que possuam carboidratos na sua estrutura.

### **Conflito de interesses**

A metodologia apresentada faz parte da patente (em depósito) sob autoria dos autores e titularidade da UFU e BIOGENETICS.

### **2.6 - Referências**

- Balvedi, R. P. A., Caetano, L. P., Madurro, J. M., Brito-Madurro, A. G., 2016. Use of 3,3',5,5' tetramethylbenzidine as new electrochemical indicator of DNA hybridization and its application in genosensor. *Biosens Bioelectron.* 85, 226-231.  
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.05.016>
- Castillo, J. J., Svendsen, W. E., Rozlosnik, N., Escobar, P., Martinez, F., Castillo-Leon, J., 2013. Detection of cancer cells using a peptide nanotube–folic acid modified graphene electrode, *Analyst.* 138,1026–1031.  
<https://doi.org/10.1039/C2AN36121C>
- Cerrato-Alvarez, M., Bernalte, E., Bernalte-García, M. J., & Pinilla-Gil, E., 2018. Fast and direct amperometric analysis of polyphenols in beers using tyrosinase-modified screen-printed gold nanoparticles biosensors. *Talanta.* Just Accepted Manuscript doi:10.1016/j.talanta.2018.09.093.  
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.09.093>

- Chen, D., Feng, H., Li, J., 2012. Graphene oxide: preparation, functionalization, and electrochemical applications. *Chem. Rev.* 112, 6027–6053.  
<https://doi.org/10.1021/cr300115g>
- Chimara, E., Ferrazoli, L., Ueky, S. Y., Martins, M. C., Durham, A. M., Arbeit, R. D., & Leão, S. C., 2008. Reliable identification of mycobacterial species by PCR-restriction enzyme analysis (PRA)-hsp65 in a reference laboratory and elaboration of a sequence-based extended algorithm of PRA-hsp65 patterns. *BMC microbiology* 8, 48.  
<https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-48>
- Díaz-González, M., González-García, M. B., Costa-García, A., 2005. Immunosensor for *Mycobacterium tuberculosis* on screen-printed carbon electrodes. *Biosensors and Bioelectronics*, 20(10), 2035–2043.  
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2004.09.035>
- Euzéby, J. P. List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature - Genus *Mycobacterium*. Disponível em: <http://www.bacterio.net/mycobacterium.html>  
Acesso em: jan 2019.
- Fatimah, S. M., Mohd, H. M. Z., Jaafar, A., Ruzniza, M. Z., Hong, N. L. I., Yusran. S. I., Norizah, A. R., 2017. Synthesis and Characterization of Polyaniline/Graphene Composite Nanofiber and Its Application as an Electrochemical DNA Biosensor for the Detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *Sensors*, 17(12), 2789.  
<https://doi.org/10.3390/s17122789>
- Georges, J., Arnaud, N., Parise, L., 1996. Limitations arising from optical saturation in fluorescence and thermal lens spectrometries using pulsed laser excitation: Application to the determination of the fluorescence quantum yield of rhodamine 6G. *Applied Spectroscopy*. 50(12), 1505-1511.  
<https://doi.org/10.1366/0003702963904511>
- Ho, J. A., Chang, H.-C., Shih, N.-Y., Wu, L.-C., Chang, Y.-F., Chen, C.-C., Chou, C., 2010. Diagnostic Detection of Human Lung Cancer-Associated Antigen Using a Gold Nanoparticle-Based Electrochemical Immunosensor. *Analytical Chemistry*, 82(14), 5944–5950.  
<https://doi.org/10.1021/ac1001959>
- Hosseini, H., Behbahani, M., Mahyari, M., Kazerooni, H., Bagheri, A., Shaabani, A., 2014. Ordered carbohydrate-derived porous carbons immobilized gold nanoparticles as a new electrode material for electrocatalytical oxidation and

determination of nicotinamide adenine dinucleotide. *Biosensor & Bioelectronics*. 59, 412-417.

<https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.02.046>

Jarzembowski, J. A.; Young, M. B., 2008. Nontuberculous Mycobacterial Infections. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 132, 1333-1341.

Kamal, A., Kumar, N., Bhalla, V., 2013. Rhodamine-dimethyliminocinnamyl based electrochemical sensors for selective detection of iron (II). *Sens Act B Chem*. 190: 127-133.

<https://doi.org/10.1016/j.snb.2013.08.079>

Kellogg, J. A., Bankert, D. A., Withers, G. S., Sweimler, W., Kiehn T. E., Pfyffer, G. E., 2001. Application of the Sherlock mycobacteria identification system using high performance liquid chromatography in a clinical laboratory. *Journal of Clinical Microbiology* 39(3), 964-970.

<https://doi.org/10.1128/JCM.39.3.964-970.2001>

Kim, H., Lee, D-H., Son, Y-A., 2013. Electrochemical Study on Rhodamine 6G-Indole Based Dye for HOMO and LUMO Energy Levels. *Text. Coloration Finish*. 25, 7-12.

<https://doi.org/10.5764/TCF.2013.25.1.7>

Kim, K., Lee, H., Lee, M. K., Lee, S. A., Shim, T. S., Lim, S. Y., Koh, W. J., Yim, J. J., Munkhtsetseg, B., Kim, W., Chung, S. I., Kook, Y. H., Kim, B. J., 2010. Development and Application of Multiprobe Real-time PCR Method Targeting hsp65 Gene for Differentiation of Mycobacterium Species from Isolates and Sputum Specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 48(9) 3073-3080.

<https://doi.org/10.1128/JCM.00939-10>

Mohanty, S. P., Kougianos, E., 2006. Biosensors: a tutorial review. *IEEE Potentials*. 25(2), 35-40.

<https://doi.org/10.1109/MP.2006.1649009>

Nascimento, V. B., Angnes, I., 1998. Eletrodos fabricados por "silk-screen". *Quím. Nova*. 21(5), 614-629.

<https://doi.org/10.1590/S0100-40421998000500014>

Ngan, G. J., Ng, L. M., Jureen, R., Lin, R. T., Teo, J. W., 2011. Development of multiplex PCR assays based on the 16S-23S rRNA internal transcribed spacer for the detection of clinically relevant nontuberculous mycobacteria. *Lett. Appl. Microbiol*. 52(5) 546-554.

<https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2011.03045.x>

Trévenot, D. R., Toth, K., Durst, R. A., Wilson, G. S., 2001. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosensor & Bioelectronics*. 16, 121-131.

[https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(01\)00115-4](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(01)00115-4)

Orságová, K. Z., Oriňak, A., Oriňaková, R., Petruš, O., Macko, J., Radoňak, J., Sukovská, L. L., Jurašková, Z., Smith, R., Strečková, M., Koval, K., 2018. Electrochemically deposited silver detection substrate for surface-enhanced Raman spectroscopy cancer diagnostics. *J Biomed Opt.* 23(7), 1-11.

<https://doi.org/10.1117/1.JBO.23.7.075002>

Pereira, A. C., Santos, A. S., Kubota, L. T., 2002. Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas. *Quím. Nova*. 25(6), 1012-1021.

<https://doi.org/10.1590/S0100-40422002000600019>

Richards, A. D., Rodgers, A., 2007. Synthetic metallomolecules as agents for the control of DNA structure. *Chemical Rev.* 36(3), 471-483.

<https://doi.org/10.1039/B609495C>

Riello, F. N., Brígido, R. T., Araújo, S., Moreira, T. A., Goulart, L. R., Goulart, I. M., 2016. Diagnosis of mycobacterial infections based on acid-fast bacilli test and bacterial growth time and implications on treatment and disease outcome. *BMC Infect Dis.* 1(16), 142.

<https://doi.org/10.1186/s12879-016-1474-6>

Scherer, L. C., Sperhake, R. D., Jarczewski, C., Cafrune, P. I., Michelon, C.T., Rupenthal, R., Ribeiro, M. O., Netto, A. R., Rossetti, M. L., Kritski, A. L., 2011. Comparison of two laboratory-developed PCR methods for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in Brazilian patients with and without HIV infection. *BMC Pulmonary Medicine* 11(15), 1-24.

<https://doi.org/10.1186/1471-2466-11-15>

Surabhi, L., Ritu, D., Abhijeet, D., Vithal, P. M., Ajoy, V., Nagendra, S., Tarun, K. S., Jaya S. T., 2018. Aptamer-based TB antigen tests for the rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis: Potential utility in screening for tuberculosis. *ACS Infect. Dis.*, Just Accepted Manuscript doi: 10.1021/acsinfecdis.8b00201.

<https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.8b00201>

- Tran, M., Fallatah, A., Whale, A., Padalkar, S., 2018. Utilization of Inexpensive Carbon-Based Substrates as Platforms for Sensing. *Sensors (Basel)*. 18(8), 27.  
<https://doi.org/10.3390/s18082444>
- Telenti, A., Marchesi, F., Balz, M., Bally, F., Böttger, E. C., & Bodmer, T., 1993. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *Journal of clinical microbiology* 31(2), 175-8.
- Verma, V. K., Tapadia, K., Maharana, T., & Sharma, A., 2018. Convenient and ultra-sensitive fluorescence detection of bovine serum albumin by using Rhodamine-6G modified gold nanoparticles in biological samples. *Luminescence*. Just Accepted Manuscript doi:10.1002/bio.3563.  
<https://doi.org/10.1002/bio.3563>
- Vural, T., Yaman, Y. T., Ozturk, S., Abaci, S., & Denkbaz, E. B., 2018. Electrochemical immunoassay for detection of prostate specific antigen based on peptide nanotube-gold nanoparticle-polyaniline immobilized pencil graphite electrode. *Journal of Colloid and Interface Science*, 510, 318–326.  
<https://doi.org/10.1016/j.jcis.2017.09.079>
- Waters, W.R., Maggioli, M.F., Palmer, M.V., Thacker, T.C., McGill, J.L., Vordermeier, H.M., Berney-Meyer, L., Jacobs, W.R., Larsen, M.H., 2016. Interleukin-17A as a biomarker for bovine tuberculosis. *Clin. Vaccine Immunol.* 23, 168-180.  
<https://doi.org/10.1128/CVI.00637-15>
- WHO, Global Tuberculosis Report. 2017.
- Wu, T. L., Chia, J. H., Kuo, A. J., Su, L. H., Wu, T. S., Lai, H. C., 2008. Rapid identifications of micobactéria from smear-positive sputum samples by nested PCR-restriction fragment length polymorphism analysis. *Journal of Clinical Microbiology* 46, 3591-3594.  
<https://doi.org/10.1128/JCM.00856-08>

# Capítulo III

## Artigo 2:

**NOVA TÉCNICA PARA DETECÇÃO DE *MYCOBACTERIUM LEPRAE* EM  
AMOSTRAS DE RASPADO DÉRMICO DE PACIENTES COM HANSENÍASE  
USANDO BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO**

Versão em português do artigo que será submetido à revista Lancet Infectious Diseases. Fator de impacto: 25,148.

## **NOVA TÉCNICA PARA DETECÇÃO DE *MYCOBACTERIUM LEPRAE* EM AMOSTRAS DE RASPADO DÉRMICO DE PACIENTES COM HANSENÍASE USANDO BIOCSENSOR ELETROQUÍMICO**

Fabiane Nunes Riello<sup>1\*</sup>, Ana Flávia Oliveira Notário<sup>1</sup>, Douglas Eulálio Antunes<sup>2</sup> Luiz Ricardo Goulart<sup>1\*</sup>, Isabela Maria Bernardes Goulart<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Nanotecnologia, Instituto de Biotecnologia, Universidade Federal de Uberlândia, Campus Umuarama Bloco 2E Sala 248, CEP 38402-022, Uberlândia – MG, Brasil;

<sup>2</sup> Centro de Referência Nacional em Dermatologia Sanitária e Hanseníase, Hospital de Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Rua Capricórnio, 94 - Bloco 1CKA - Jardim Brasília, CEP 38401-404, Uberlândia – MG, Brasil;

Autores correspondentes: Luiz Ricardo Goulart, E-mail: [lrgoulart@gmail.com](mailto:lrgoulart@gmail.com) e Fabiane Nunes Riello, E-mail: [fabiriello@yahoo.com.br](mailto:fabiriello@yahoo.com.br) [douglas.eulalio1@gmail.com](mailto:douglas.eulalio1@gmail.com); [flavia.notario@hotmail.com](mailto:flavia.notario@hotmail.com); [imbgoulart@gmail.com](mailto:imbgoulart@gmail.com)

### **3.1 Resumo**

**Introdução:** Técnicas sorológicas e moleculares auxiliam no diagnóstico clínico da hanseníase, porém, requerem equipamentos e infraestrutura de alto custo e são pouco sensíveis em alguns casos. Métodos que envolvem a detecção eletroquímica têm mostrado novas possibilidades para o diagnóstico de doenças infecciosas. Com isso foi desenvolvido um biossensor eletroquímico para detecção qualitativa e quantitativa de *Mycobacterium leprae* em amostras de raspado dérmico visando avaliar sua utilização como uma ferramenta inovadora no diagnóstico da hanseníase.

**Métodos:** Amostras de raspado dérmico de pacientes diagnosticados com hanseníase, com diferentes concentrações de bacilos e de contatos saudáveis, quantificados anteriormente por PCR em tempo real (qPCR/RLEP) de *M. leprae*, foram testadas num biossensor eletroquímico desenvolvido com eletrodos de carbono do tipo *screen-printed* funcionalizados com rodamina 6G. As leituras foram realizadas em potenciostato portátil e a diferença quantitativa foi dada por meio de regressão linear dos valores dos picos de oxidação nas medidas de voltametria cíclica. Foram realizadas análises estatísticas de Kruskal-Wallis, correlação de Spearman, curva ROC e indicadores de teste diagnóstico, utilizando o programa GraphPad Prism 7.0.

**Resultados:** A nova técnica para detecção de *M. leprae* em amostras de raspado dérmico usando biossensores eletroquímicos, mostrou ser mais sensível (S: 88,4%) e com maior acurácia (A: 81,84%) quando comparada aos testes Elisa (S: 74,4%; A: 76,34%) e qPCR (S: 72,7%; A: 74,97%). Através da curva ROC comprovou-se que o biossensor desenvolvido também é o melhor teste dentre os 3 para discriminar doença em um grupo de pacientes. De acordo com a sensibilidade e especificidade combinadas entre 2 testes em série, a combinação entre o biossensor e qPCR permitiu obter a maior dentre as especificidades (96%).

**Interpretação:** O novo biossensor eletroquímico de maneira pioneira foi usado e demonstrou performance relevante na detecção de *M. leprae* utilizando amostras biológicas diretas de pacientes e contatos. A alta sensibilidade do biossensor incorporada com as técnicas já existentes de qPCR aumentam a especificidade e permitem a identificação de um grande número de contatos assintomáticos, apresentando um grande potencial para auxiliar no diagnóstico precoce da hanseníase. Importante enfatizar que o biossensor inovador desenvolvido nesse trabalho é portátil, rápido, sensível, específico, com baixo custo e pode ser usado para triagem de pacientes em campo.

### 3.2 Introdução

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica causada pelo bacilo *Mycobacterium leprae*, que acomete principalmente a pele e células de Schwann dos nervos periféricos, é considerada uma das principais causas de incapacidades físicas, em razão do seu potencial de causar lesões neurais.<sup>1,2</sup>

A susceptibilidade ao *M. leprae* está ligada à predisposição genética, imunidade e estado nutricional, mas também está fortemente relacionada a condições econômicas, sociais e ambientais desfavoráveis, somando-se a esses fatores o desconhecimento da população aos sinais e sintomas e a dificuldade de acesso a rede pública de saúde pela população mais vulnerável.<sup>3</sup> Assim, este micro-organismo possui baixa infectividade, alta patogenicidade e longo período de incubação em média, de 2 a 7 anos, dificultando seu diagnóstico devido aos sintomas e sinais insidiosos.<sup>1</sup>

A transmissão ocorre pelas vias aéreas superiores de pacientes não tratados portadores de bacilos que entram em contato próximo e prolongado com indivíduos suscetíveis, assim familiares de pessoas com hanseníase possuem maior chance de adoecer.<sup>4</sup>

Contatos domiciliares assintomáticos que possuam positividade em exames moleculares e/ ou sorrológicos tem maior risco de desenvolver a doença, já que são comprovadamente abrigados pelo *M. Leprae*, podendo disseminar o bacilo, mantendo a cadeia de transmissão da hanseníase.<sup>4,5,6,7</sup> Nesses indivíduos observou-se também uma chance quatro vezes maior de ocorrência de comprometimento neural periférico.<sup>8</sup>

A hanseníase continua sendo um problema de saúde pública, ainda é endêmica em algumas regiões como Américas, África e Ásia. Durante 2017, foram notificados 210.671 novos casos em 150 países, e a taxa de detecção foi de 2,77 por 100.000 habitantes. O Sudeste Asiático foi responsável por 73% da sobrecarga de hanseníase global, e dois países, Índia e Indonésia, contribuíram com 67,4% dos novos casos em todo o mundo e 92,6% regionalmente. O Brasil contribuiu com 92,3% de casos novos de hanseníase na região das Américas, sendo o segundo país com maior prevalência de hanseníase no mundo. Os 3 países com os maiores encargos - Índia (126.164), Brasil (26.875) e Indonésia (15.910) - foram responsáveis por 80,2% da carga global de novos casos em 2017.<sup>9</sup>

Entre 2008 e 2017 a OMS reportou uma diminuição lenta na detecção de novos casos em todo o mundo de 249.007 em 2008 para 210.671 em 2017. No entanto, 5 regiões reportaram aumentos no número de novos casos; 1.032 casos foram relatados na África e 1.745 nas Américas, dos quais 1.657 casos foram em Brasil. Esse aumento é atribuível principalmente à melhor detecção de casos, mas também o impacto de fatores como a conscientização da hanseníase na comunidade, e a capacidade do sistema de saúde na detecção precoce da hanseníase.<sup>9</sup>

Além de ser uma doença de notificação compulsória e de investigação obrigatória no Brasil, a hanseníase continua a ser uma doença negligenciada. A Sociedade Brasileira de Hansenologia (SBH) afirma que existem lacunas no relato de novos casos em cerca de 530 milhões de pessoas em 64 países 'em desenvolvimento', onde geralmente existem condições favoráveis para a hanseníase, a OMS não reportou aumento no número de casos entre 2016 e 2017. Entretanto, de acordo com a SBH, o Brasil continua com alto índice de diagnósticos de hanseníase

e o número real em território nacional pode ser de até 8 vezes maior que os dados oficiais.<sup>10</sup>

A hanseníase é uma doença complexa e possui várias formas clínicas dentro do espectro de Ridley & Jopling (1966), de acordo com a resposta imune celular e carga bacilar. São elas: tuberculóide (TT), borderline-tuberculóide (BT), borderline-borderline (BB), borderline-lepromatosa (BL) e lepromatosa (LL). De um lado do espectro o pólo tuberculóide, com baixa carga bacilar e exacerbada imunidade celular. Do outro lado do espectro, o pólo lepromatoso, tem baixa ou ausente imunidade celular ao *M. leprae* e exacerbada resposta humoral, que é diretamente proporcional à carga bacilar.<sup>11</sup>

A classificação operacional da doença, proposta pela OMS para fins de tratamento baseia-se no número de lesões, sendo classificadas em paucibacilares (PB) com até 5 lesões de pele e baciloscopia negativa, e multibacilares (MB) com mais de 5 lesões e/ou baciloscopia positiva. Pacientes multibacilares possuem alta carga bacilar, tendo um importante papel como grupo transmissor.<sup>12</sup>

A OMS publicou a Estratégia Global para Hanseníase 2016-2020 que visa atingir metas para reduzir a prevalência da doença e uma delas é baseada no desenvolvimento de estratégias e ferramentas, que incluem novas técnicas diagnósticas para detecção precoce de casos, triagem direcionada e monitoramento de contatos domiciliares e sociais, o que consideram crucial para interromper a transmissão e evitar a progressão da hanseníase.<sup>13</sup>

O diagnóstico atual é baseado em exames clínicos dermatoneurológicos, entretanto, a avaliação clínica detecta a doença, em vez da infecção subclínica e bacteriológica, e em torno de 30% dos pacientes, inclusive pacientes multibacilares (MB), não apresentam sintomas.<sup>14</sup>

Técnicas sorológicas e moleculares auxiliam na detecção do *M. leprae*. Há alguns anos a técnica de reação em cadeia polimerase (PCR) vem revolucionando o diagnóstico molecular laboratorial, apresentando boa sensibilidade em até 100% em casos de hanseníase multibacilar, mas geralmente é pouco sensível (inferior a 50%) em casos de hanseníase paucibacilar.<sup>5,7,8,15,16,17,18,19</sup> Além disso, a tecnologia de PCR requer mão de obra especializada, equipamentos e infraestrutura de alto custo, são testes para diagnóstico diferencial e complementar e não são utilizados na rotina dos serviços de atenção primária, e sim, nos serviços de referência e em pesquisas.<sup>20</sup>

Portanto, existe uma clara necessidade e interesse crescente no desenvolvimento de métodos simples, de baixo custo, rápidos, específicos e sensíveis para detectar infecção subclínica e que possa ser usado tanto para confirmar o diagnóstico em pessoas com suspeita da doença, como para rastrear contatos de pacientes em grupos populacionais com alto risco para a hanseníase.<sup>21</sup>

Métodos que envolvem a detecção eletroquímica têm mostrado novas possibilidades para o diagnóstico de doenças infecciosas ou outras doenças.<sup>22</sup>

O biossensor é um dispositivo integrado e autossuficiente capaz de fornecer informações analíticas, quantitativas ou semi-quantitativas utilizando um elemento de reconhecimento biológico (receptor ou sonda) que garante a especificidade à um determinado analito (ou alvo) produzindo uma resposta que é traduzida por um componente físico principalmente em sinais óptico ou elétrico.<sup>23</sup>

Dentre as características desejáveis ou ideais em relação a um biossensor podemos considerar: seletividade, sensibilidade, estabilidade, reprodutibilidade, baixo custo e simplicidade de operacionalização.<sup>24</sup>

Um bioeletrodo de grafite modificado com poli (4-aminofenol) foi produzido para detecção do gene *Mycobacterium leprae* por imobilização de DNA de fita simples (ssDNA) e hibridação com produto de PCR (RLEP) (gene específico de *M. leprae*) e, foi capaz de reconhecer moléculas de DNA complementares através do processo de hibridação.<sup>26</sup>

Nosso grupo de estudo desenvolveu uma plataforma utilizando biomateriais que é capaz de reconhecer biomoléculas que possuam carboidratos em sua estrutura, possibilitando a construção de biossensores universais e estáveis utilizando amostras biológicas diretas, que pode ser explorado no diagnóstico da hanseníase, já que sua resistente parede celular é formada por arranjos complexos de moléculas de carboidratos, lipídios, peptideoglicanos e proteínas, característica do gênero *Mycobacterium*.<sup>26</sup>

O biossensor desenvolvido neste estudo utiliza reconhecimento antígeno-anticorpo usando como sonda o anticorpo anti-PGL-I que reconhece especificamente o alvo glicolipídeo fenólico 1 (PGL-I), um glicolipídeo abundante na parede celular de *M. leprae* e tem sido amplamente utilizado em testes sorológicos na classificação operacional da hanseníase, podendo ser aplicado para diferenciar pacientes paucibacilares e multibacilares, bem como monitorar infecção subclínica em contatos.<sup>4,6,27,28,29</sup>

Até o presente momento não existe relato na literatura que utiliza biossensor eletroquímico no diagnóstico de hanseníase utilizando amostras clínicas. Com isso, objetivou-se a validação do biossensor eletroquímico para detecção qualitativa e quantitativa de *Mycobacterium leprae* em amostras de raspado dérmico visando avaliar seu potencial para o diagnóstico da hanseníase.

### **3.3 Métodos**

#### Desenho do estudo

Foi realizado um estudo transversal entre os anos de 2017 e 2018, cuja amostra composta por 43 pacientes com diagnóstico de hanseníase e 12 contatos domiciliares atendidos no Centro Nacional de Referência em Dermatologia Sanitária e Hanseníase (CREDESH), do Hospital de Clínicas (HC), da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), MG, Brasil.

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia (n° 099/2003 e n° 499/2008).

#### Amostras

Foram utilizadas no estudo 55 amostras de raspado dérmico, 43 de pacientes com diagnóstico de hanseníase em início de tratamento e 12 amostras de contatos domiciliares sadios.

As amostras de raspados dérmicos de cada indivíduo foram coletadas em 7 sítios do corpo (dois lóbulos das orelhas, dois cotovelos, dois joelhos e uma lesão/área) em pacientes e seis sítios corporais (dois lóbulos das orelhas, dois cotovelos e dois joelhos) em contatos familiares para realização de esfregaços em lâminas para baciloscopia. Concomitantemente, foram coletadas amostras desses mesmos sítios depositadas em 2 microtubos estéreis tipo eppendorff: um tubo continha 500 µL de tampão de lise nuclear (TLN – NaCl 400 mM, EDTA 50 mM, pH 8,0 e Tris-Cl 25 mM, pH 8,0) para realização da qPCR; e o outro tubo 250 µL de tampão fosfato (TF - K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1M pH 7) para o teste com biossensor eletroquímico. As amostras foram armazenadas à temperatura de 4°C até a realização dos testes.

#### Critério de seleção dos pacientes e contatos

Pacientes de hanseníase são aqueles que foram diagnosticados por meio de exame clínico dermatoneurológico para identificar lesões ou áreas de pele com

alteração de sensibilidade e/ou comprometimento de nervos periféricos, com alterações sensitivas e/ou motoras e/ou autonômicas e os seguintes exames laboratoriais: raspado dérmico de sete sítios em pacientes, conforme descrito acima, para realização de baciloscopia e qPCR para detecção de DNA de *M. leprae* com primer RLEP, conforme descrito em trabalho anterior<sup>18</sup>; biópsia de lesão/área para histopatologia, coloração pelo Fite-Faraco e qPCR; sorologia ELISA IgM anti-PGL-I, conforme descrito em estudos anteriores.<sup>7,29</sup> Foram classificados conforme a forma clínica da doença em: borderline-tuberculóide (BT=24), borderline-borderline (BB=4), borderline-lepromatoso (BL=6) e lepromatoso (LL=9).<sup>11</sup>

Os contatos domiciliares são indivíduos que residam ou tenham residido com o doente nos últimos cinco anos e apresentaram exame clínico dermatoneurológico normal, que também foram encaminhados para a realização de sorologia ELISA IgM anti-PGL-I e raspado dérmico de seis sítios (dois lóbulos de orelhas, dois cotovelos, dois joelhos) para baciloscopia e extração de DNA e para análise pela qPCR para detecção de DNA de *M. leprae* com primer RLEP.

Foram excluídos do teste amostras de indivíduos que não continuaram o acompanhamento no CREDESH ou não possuíam todos os dados necessários para análise comparativa.

As 55 amostras com o número de bacilos já quantificados por qPCR foram utilizadas para os testes de sensoriamento eletroquímico e foram comparadas com diagnóstico clínico, ELISA anti-PGL-I e qPCR para detecção de DNA de *M. leprae*.

### Análises eletroquímicas

O eletrodo do tipo *screen-printed* (DropSens DRP 110), com um eletrodo de trabalho de grafite (4 mm de diâmetro), contra eletrodo de grafite e eletrodo de referência de prata/cloreto de prata (Ag/AgCl) foi funcionalizado com Rodamina 6G para uniformização e maior aderência das amostras à área de trabalho. Adsorção eletroquímica e medidas voltamétricas foram realizados utilizando um potenciostato portátil PalmSens 3 (Compact Electrochemical Interfaces). As leituras foram feitas com software PStace.

### Padronização da técnica e especificidade

O antígeno PGL-I nativo (BEI Resources-NR-19342) foi utilizado para padronização no novo teste e para posterior comparação com os valores das diluições

de PGL-1 e a quantidade desse antígeno presente nas amostras de raspado. Outro antígeno não específico, LAM de *M. leprae* (BEI Resources-NR-19348) e outro anticorpo, anti-LAM (BEI Resources-NR-19358) foram usados para garantir a especificidade do teste.

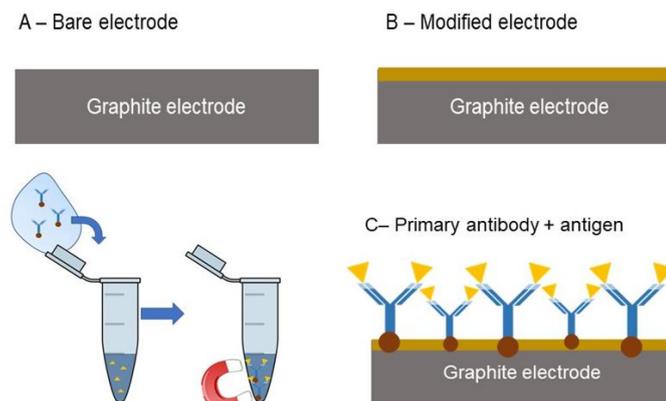
Dessa forma, o anticorpo policlonal anti-PGL-I de *M. leprae* (BEI Resources-NR19355) (1:1000) foi aplicado na superfície de trabalho de eletrodos funcionalizados com rodamina 6G e incubados a temperatura ambiente por alguns minutos. Posteriormente foram incubados com diferentes diluições de PGL-I nativo ou com LAM de *M. leprae* (0,5µg/µL) por mais alguns minutos e lavados com água destilada. O teste com anti-LAM (1:1000) foi realizado da mesma forma aplicando esse anticorpo no eletrodo e incubando com o PGL-I nativo (0,5µg/µL).

A detecção realizada através de medidas de voltametria cíclica entre -0,3V a 0,8V, com um potencial de 20mV e taxa de varredura de 0,2V/s em potenciostato portátil, utilizando a solução eletrolítica  $K_4Fe(CN)_6 / K_3Fe(CN)_6$  5mM em KCl 0,1M como eletrólito suporte.

#### Detecção em amostras de raspado dérmico

O anticorpo específico de *M. leprae* anti-PGL-I (1:500) foi bioconjugado a nanopartículas magnéticas  $COFe_2O_4$ .<sup>30</sup> Após, 50 µL de amostras de raspado de pacientes e contatos foram incubadas ao anticorpo conjugado por 30 min a 37°C. O conjugado antígeno-anticorpo foi lavado com PBS1X em estante magnética e a parte presa ao ímã foi ressuspensa em PBS e 3 µl foram aplicados na superfície da área de trabalho do eletrodo funcionalizado com rodamina 6G e incubados a temperatura ambiente durante 15 minutos (Esquema 1).

A detecção foi realizada através de medidas de voltametria cíclica como descrito acima.



*Esquema 1. A sequência mostra a modificação de eletrodos screen-printed de grafite com Rodamina 6G (A e B), conjugação dos anticorpos anti-PGL-I com nanopartículas magnéticas, incubação com raspados e aplicação do bioconjugado nos eletrodos (C).*

### Análises Estatísticas

O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para verificar a diferença entre os postos médios em relação aos valores obtidos usando o biossensor, ELISA anti-PGL-I e qPCR DNA *M. leprae* encontrados para contatos intradomiciliares e formas clínicas da doença (BT, BB, BL e LL). A correlação de Spearman foi utilizada para analisar a magnitude da associação entre os testes eletroquímicos ELISA anti-PGL-I e qPCR no grupo de pacientes.

Com o objetivo de avaliar o melhor teste de desempenho, entre eletroquímica, ELISA anti-PGL-I e qPCR, foram calculados os indicadores de um teste diagnóstico, como sensibilidade, especificidade, *likelihood ratio* positivo (LR+), *likelihood ratio* negativo (LR-), acurácia e prevalência. As curvas *Receiver Operating Characteristic* (ROC) foram obtidas para calcular a área sob a curva para determinar o teste com melhor poder discriminatório. Os programas utilizados para cálculos estatísticos foram o GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). O nível de significância  $\alpha$  foi de 5% para todas as análises.

### Criação do aplicativo para análise dos resultados

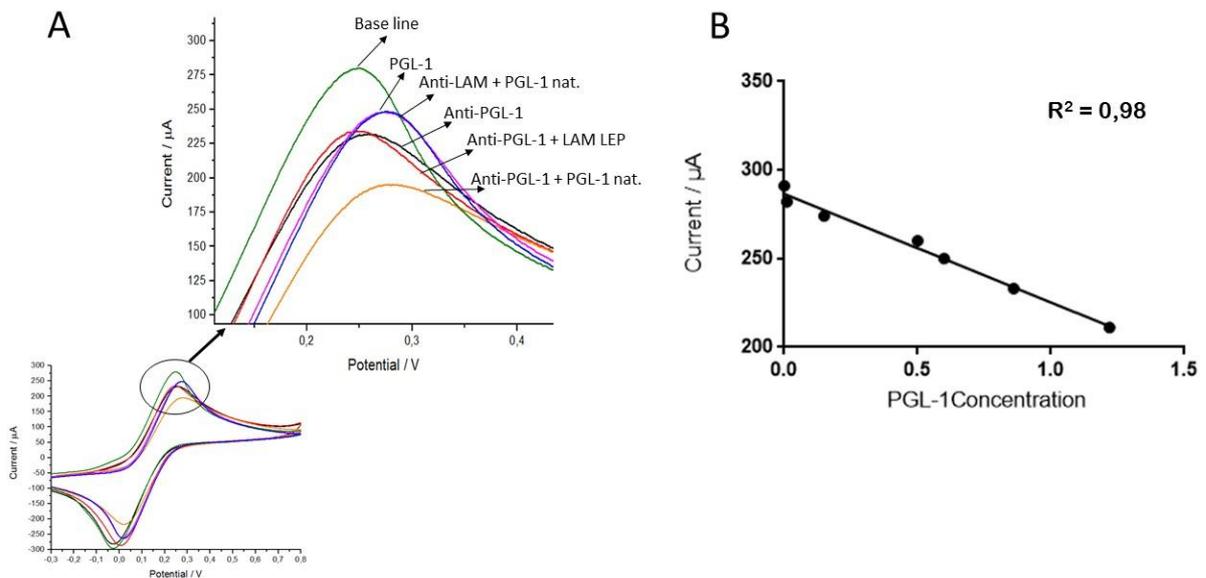
Com o programa Ionic Creatro foi desenvolvido o aplicativo Hansen, com intuito de simplificar e agilizar a entrega dos resultados obtivos. Dessa forma os valores dos picos de oxidação das curvas em voltametria cíclica foram inseridos em local específico no aplicativo e valores de quantidade de bacilo foram calculadas com base nas equações de regressão linear.

## **3.4 Resultados**

A nova técnica para detecção de antígenos por biossensores eletroquímicos foi desenvolvida e padronizada com base no reconhecimento antígeno (PGL-I) e anticorpo (anti-PGL-I). Os resultados mostraram que quando ocorre o reconhecimento específico entre eles, a difusão da sonda no ferro/ferri diminui no sistema fazendo com

que o pico da corrente de oxidação seja menor comparado aos picos de oxidação da linha base (sem amostras), do eletrodo somente com anti-PGL-I e somente com PGL-I. Também mostrou ser específico, já que não houve reconhecimento entre o anti-PGL-I e outro antígeno não específico (LAM de *M. leprae*) e do anti-LAM com o PGL-I nativo (fig. 1A).

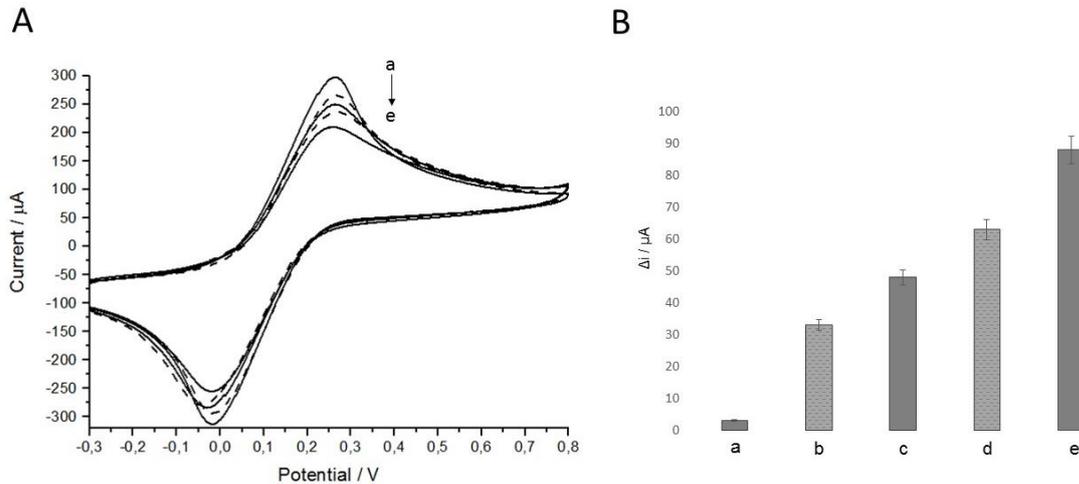
Os valores dos picos de corrente de oxidação para cada concentração de PGL-I detectadas foram plotados em um gráfico de regressão linear, e chegou-se na equação da reta  $y = -63,145x + 288,34$  que melhor representa a disposição dos pontos no gráfico. Essa reta foi utilizada como referência para quantificação de PGL-I em todas amostras de raspados. A calibração da curva foi calculada a partir dos resultados, mostrando que o sistema tem um coeficiente de correlação linear de 0,98 e um limite de detecção de  $0,01\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (Fig. 1B).



**Fig.1.** (A) Picos de corrente de oxidação em voltametria cíclica (potencial 20mV e taxa de varredura 0,2V/s); (B) Gráfico corrente ( $\mu\text{A}$ ) X Concentração PGL-I ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) obtidos pelo pico de oxidação na voltametria cíclica substituídos na equação ( $y = -63,145x + 288,34$ ).

Com base nos valores médios de quantidade de bacilos dados pela qPCR, os valores dos picos de corrente de oxidação foram plotados em outro gráfico de regressão linear, e chegou-se na equação da reta  $y = -0,0206x + 2,4541$  com

coeficiente de correlação linear de 0,97. Essa reta foi utilizada como referência para quantificação de bacilos em todas amostras de raspados, apresentando um intervalo de detecção de 1 a 1.000.000 de bacilos (Fig.2)



**Fig.2.** (A) Voltametria cíclica-VC (potencial 20mV e taxa de varredura 0,2V/s) indicando os valores das correntes em  $\mu\text{A}$  dos picos de oxidação. (B)  $\Delta i$  = diferença do pico de oxidação na VC da linha base (eletrodo preparado apenas com rodamina 6G) com pico de oxidação das outras amostras. (a): 0 bacilos/VC = 295, (b): 30 bacilos/VC = 265, (c): 430 bacilos/VC = 250, (d): 20000 bacilos/ VC = 230, (e): 20000000 bacilos/ VC= 211.

Da amostra composta por 55 indivíduos, 12 eram contatos domiciliares e 43 casos de hanseníase, predominando dentre os doentes os borderline-tuberculóide multibacilares (BT/MB) representando 40% (22/55) da amostra seguida pelo polo lepromatoso (LL) com 16,4% (9/55). Os contatos domiciliares constituíram 21,8% (12/55) da amostra, considerado, portanto, o segundo grupo mais prevalente (Tabela 1).

Na estratificação clínica, conseqüentemente, os BT/MB e os LL apresentaram os grupos mais hegemônicos com 51,2% (22/43) e 20,9% (9/43) respectivamente, seguidos pelos borderline-lepromatoso (14%; 6/43).

O sexo feminino foi maior na amostra total (56,4%; 31/55) quando comparado ao masculino (43,6%; 24/55). A mesma relação pôde ser observada nos BL (66,6%; 4/6), BT/MB (59%; 13/22), e contatos de hanseníase (66,6%; 8/12) quando analisado por forma clínica e contactantes (tabela 1).

Ainda na tabela 1, em relação a faixa etária, observa-se um percentual elevado de indivíduos das faixas etárias entre 20 e 59 anos (54,5%; 30/55) e 20 e 39 (21,8%;

12/55). Nota-se que metade dos pacientes da forma clínica BT/MB (50%; 11/22), BL (33,3%; 2/6), LL (44,4%; 4/9) e mais da metade dos contatos (75%; 9/12) pertenciam a faixa etária entre 40 e 59 anos.

Variáveis	Situação Clínica											
	Contatos (n=12/21,8%)		BT (PB) (n=2/3,6%)		BT (MB) (n=22/40%)		BB (n=4/7,2%)		BL (n=6/10,9%)		LL (n=9/16,3%)	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
<b>Gênero</b>												
Masculino	4	33,3	1	50	9	40,9	3	75	2	33,3	5	55,5
Feminino	8	66,6	1	50	13	59	1	25	4	66,6	4	44,4
<b>Faixa Etária</b>												
0 - 19	0	0	0	0	2	9	1	25	0	0	0	0
20 - 39	0	0	1	50	5	22,72	0	0	2	33,3	4	44,4
40 - 59	9	75	1	50	11	50	3	75	2	33,3	4	44,4
≥ 60	3	25	0	0	4	18,18	0	0	2	33,3	1	11,1

**Tabela 1.** Variáveis clínicas e epidemiológicas

Foram calculados os principais indicadores de um teste diagnóstico levando em conta a amostra total de 55 indivíduos, subdivididos em casos de hanseníase e contatos domiciliares.

Tais valores foram avaliados para a sorologia ELISA anti-PGL-I, qPCR e biossensor eletroquímico e dispostos na tabela 2. Independente do teste avaliado, a prevalência da doença na amostra não varia entre os 3 testes, visto que ela representa a proporção de casos da doença antes da realização do teste indicando, portanto, uma proporção de 78.2% (43/55) doentes na amostra.

A sorologia ELISA anti-PGL-I apresentou uma sensibilidade de 74.4% (32/43) e uma especificidade de 83.3% (10/12) com acurácia de 76.3% (42/55). Esse resultado demonstra que a sorologia Elisa anti-PGL-I detecta com uma acurácia de 76.3% uma proporção de 74.4% dos indivíduos doentes multibacilares.

A qPCR, utilizada para quantificar os níveis de bacilo por grama de tecido, teve os menores indicadores dentre os 3 testes avaliados conforme mostrado na tabela 2,

com sensibilidade de 72,7% (14/43), especificidade de 83,3% (12/12) e acurácia de 74,97% (26/55).

O biossensor eletroquímico apresentou a maior sensibilidade (88,4%; 38/43) e melhor acurácia dentre os 3 testes, com uma acurácia de 81,8% (45/55), isto é, o número de verdadeiros positivos e verdadeiros negativos é melhor discriminada por este teste, além ser o melhor teste para diagnosticar indivíduos de fato doentes (verdadeiros positivos) com uma certeza de 88,4%. Porém sua especificidade foi a menor 58,3% (7/12) encontrando positividade em 5 contatos avaliados.

Embora o LR+ da sorologia ELISA anti-PGL-I seja a maior dentre os testes, 4,46, indicando que existe uma probabilidade maior de encontrar resultado positivo em indivíduos doentes quando comparados a saudáveis, o LR- do biossensor eletroquímico de 0,20 mostra que a probabilidade desse teste ser negativo em indivíduos doentes quando comparado a indivíduos saudáveis é a menor dentre os testes, o que confirma sua elevada acurácia (tabela 2).

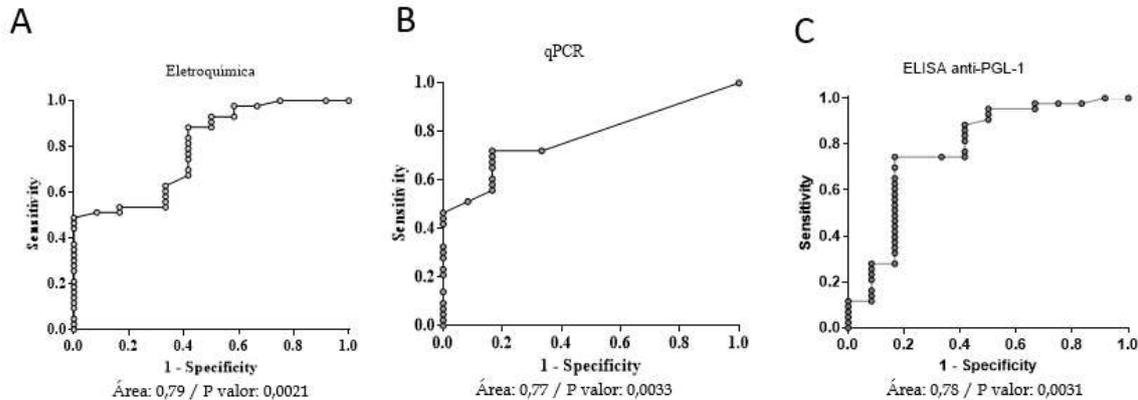
Teste	Doença		Total	Parâmetros diagnósticos					
	Presente	Ausente		Sens.	Esp.	Ac.	PD	LR+	LR-
<b>ELISA</b>									
Positivo	32	2	34						
Negativo	11	10	21	74,4%	83,3%	76,34%	78,2%	4,46	0,31
Total	43	12							
<b>qPCR</b>									
Positivo	14	0	14						
Negativo	29	12	41	72,7%	83,3%	74,97%	78,2%	4,35	0,33
Total	43	12							
<b>Biossensor Eletroquímico</b>									
Positivo	38	5	43						
Negativo	5	7	12	88,4%	58,3%	81,84%	78,2%	2,12	0,20
Total	43	12							

NOTAS: Sens.: sensibilidade / Esp.: especificidade / Ac. Acurácia / PD: prevalência da doença/ LR: Razão de verossimilhança (Likelihood Ratio) + (Positivo) / - (Negativo)

***Tabela 2. Indicadores do teste diagnóstico***

A sensibilidade e especificidade combinadas entre 2 testes em série foram obtidas para a combinação entre ELISA e biossensor eletroquímico (S: 0,65 e E: 0,92); ELISA e qPCR (S: 0,53 e E: 0,92); Eletroquímica e qPCR (S: 0,63 e E: 0,96). A combinação entre o biossensor e qPCR permitiu obter a maior dentre as especificidades, de modo que aqueles indivíduos com resultado negativo nos dois testes aumenta a certeza desse resultado.

As curvas ROC, conforme figura 3 A, B e C, representam o desempenho dos 3 testes, de maneira que, aquele teste que apresenta a maior área sob a curva tem maior poder de discriminar doentes e saudáveis. Verifica-se que a área sob a curva no teste do biossensor eletroquímico é de 0,79 (ou 79%) considerada 1% maior que a área sob a curva do teste ELISA anti-PGL-I (0,78 ou 78%), e, portanto, é o melhor teste dentre os 3 para discriminar doença em um grupo de pacientes, visto que a qPCR apresentou a menor área sob a curva 0,77 (ou 77%).



**Fig 3.** Aplicação da curva ROC sensibilidade X especificidade de cada teste diagnóstico

Em relação a tabela 3, nota-se uma correlação negativa entre a qPCR e o biossensor eletroquímico ( $r=-0,49$ ;  $p=0,001$ ) e correlação positiva entre a qPCR e o teste de PGL-I obtido na eletroquímica ( $r=0,49$ ;  $p=0,001$ ) o que demonstra a associação inversa entre o número de antígenos detectados na qPCR e a carga obtida pelo biossensor. Ainda que a correlação entre a sorologia ELISA anti-PGL-I e os valores da eletroquímica ( $r=-0,27$ ;  $p=0,075$ ) e PGL-I ( $r=0,27$ ;  $p=0,075$ ) não estiveram

presentes, essas associações são consideráveis, visto que seus coeficientes foram quase significativos.

Variáveis contínuas	Coefficientes estatísticos	Biossensor Eletroquímico	PGL-I*
ELISA	Spearman r	-0,27	0,27
	P valor	0,075	0,075
qPCR	Spearman r	-0,49	0,49
	P valor	0,001	0,001

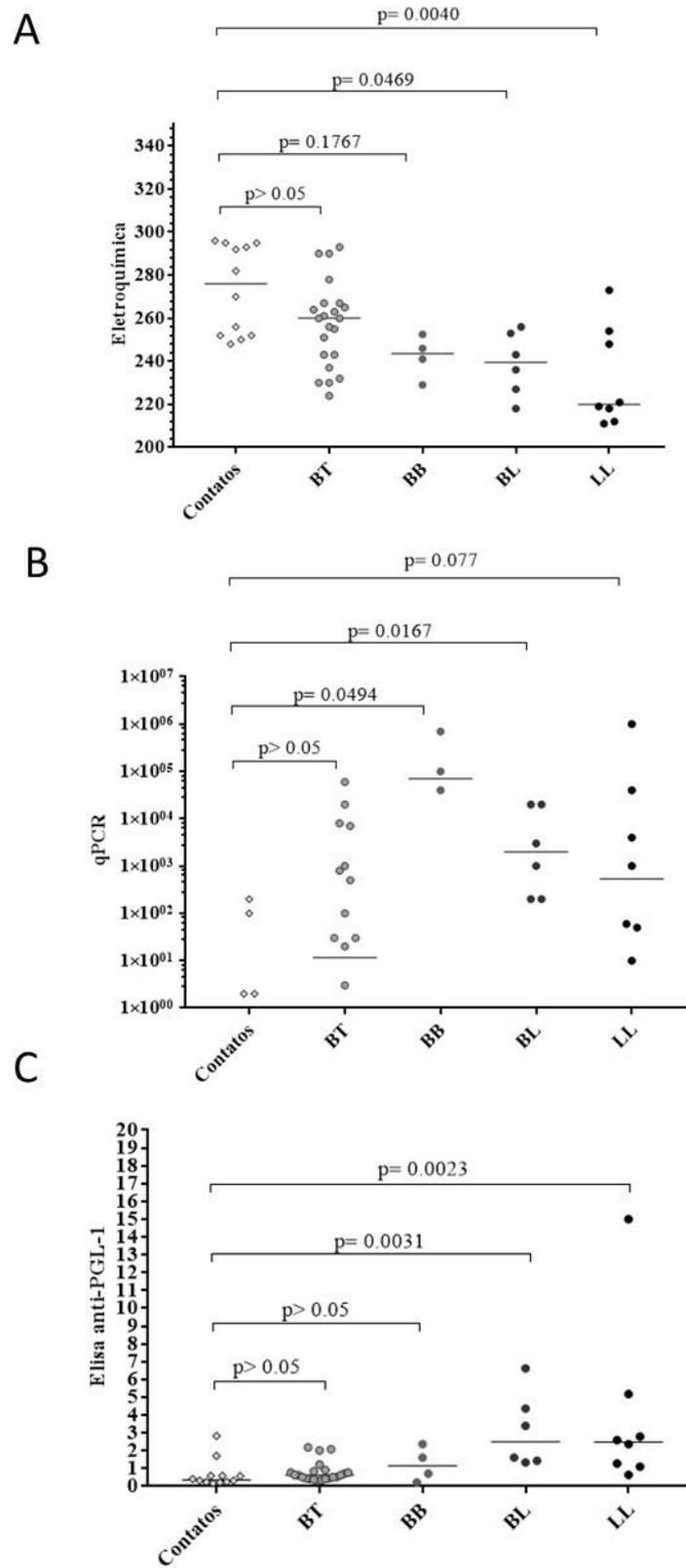
NOTAS: \* valores obtidos pelo pico de oxidação na voltametria cíclica substituídos na equação  $(-63,145x+288,34)$

**Tabela 3. Correlação entre os testes.**

A figura 4 A, representa a diferença entre a média dos postos (ranks) em relação aos valores do biossensor eletroquímico (voltametria cíclica) nos grupos contato domiciliar e formas clínicas (BT, BB, BL e LL). Por meio da comparação múltipla, teste Dunn, foi possível notar que houve diferença entre a média dos postos quando comparados os grupos contatos domiciliares e BL ( $md_{\text{contatos}}=276$  e  $md_{\text{BL}}=239.5$ ;  $p=0,0496$ ) e contatos domiciliares e LL ( $md_{\text{contatos}}=276$  e  $md_{\text{LL}}=220$ ;  $p=0,0040$ ).

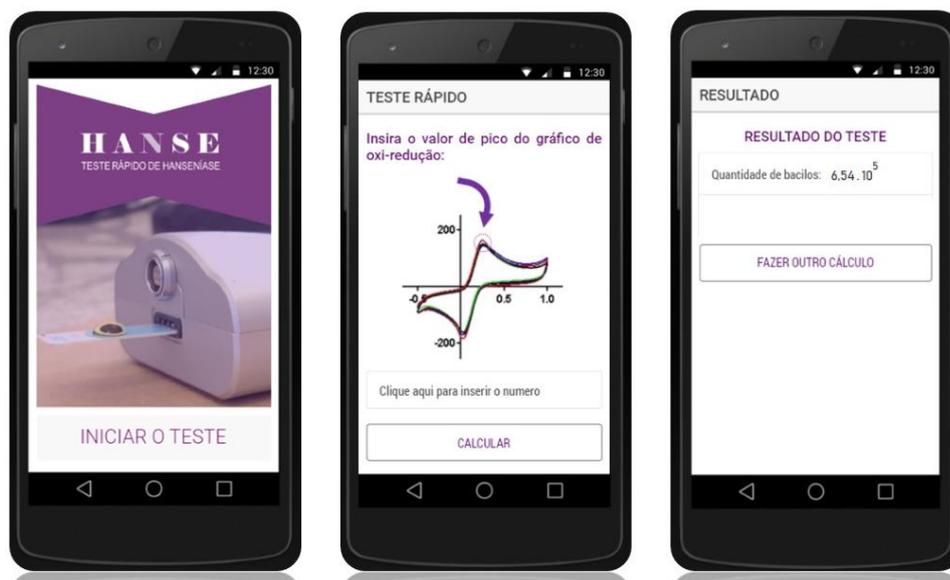
Quanto a figura 4B, nota-se que o teste de comparação múltipla em relação aos valores qPCR, não evidenciou nenhuma diferença entre as médias dos postos. Os grupos contato domiciliar ( $md_{\text{contatos}}=2$ ) e BT ( $md_{\text{BT}}=11.5$ ) apresentam elevada quantidade de participantes do estudo com valores da qPCR negativa o que não ocorreu nas demais formas clínicas da doença ( $md_{\text{BB}}=7 \times 10^4$ ;  $md_{\text{BL}}=2 \times 10^3$ ;  $md_{\text{LL}}=530$ ).

Os níveis de anti-PGL-I foram mensurados por meio da sorologia ELISA, observando-se diferença entre as médias dos ranks ao comparar os contatos domiciliares com BL ( $md_{\text{contatos}}=0,36$  e  $md_{\text{BL}}=2,50$ ;  $p=0,0031$ ) e LL ( $md_{\text{contatos}}=2,48$  e  $md_{\text{LL}}=0,36$ ;  $p=0,0023$ ). Embora os grupos BT ( $md_{\text{BT}}=0,62$ ) e BB ( $md_{\text{BB}}=1,6$ ), tivessem medianas maiores que o grupo dos contatos domiciliares, não houve diferença significativa entre esses grupos (Figura 4C).



**Fig. 4.** Comparação Multipla teste Dunn representando diferença entre as médias dos postos nos grupos contatos e forma clínica para os três testes.

Após todas as análises foi desenvolvido um aplicativo para transforção dos dados obtidos pelos valores dos picos de corrente de oxidação das curvas de voltametria cíclica, em resultados quantitativos com base nas equações de regressão linear formuladas (quantidade de bacilos) e assim viabilizar e agilizar a entrega dos resultados.



**Fig. 5.** Aplicativo desenvolvido para obtenção de resultados quantitativos.

### 3.5 Discussão

Nesse trabalho foi desenvolvido um biossensor eletroquímico que foi capaz de detectar diferentes quantidades de bacilos em amostras de raspado dérmico de doentes e contatos domiciliares, com base no reconhecimento antígeno-anticorpo graças à presença do PGL-I encontrado apenas no *Mycobacterium leprae*, que reconheceu de forma específica o anticorpo anti-PGL-I imobilizado na superfície de trabalho dos eletrodos funcionalizados com rodamina 6G, diminuindo a difusão da sonda no sistema, o que resultou em uma diminuição significativa da corrente de pico de oxidação do ferrocianeto de potássio, indicando maior afinidade deste composto, comprovando assim a detecção. Trabalho anterior usando sonda e DNA alvo também obteve a detecção da mesma forma confirmada pela diminuição da corrente de oxidação do eletrólito suporte<sup>25</sup>.

Porém, a relação quantidade de bacilo versus pico de corrente é inversa, quanto menor a corrente difusional no sistema, menor o pico de oxidação e redução observado nas medidas de voltametria cíclica e maior a quantidade de bacilos

presente na amostra. Observamos dessa forma uma relação entre que o biossensor eletroquímico e a forma clínica dos pacientes, os menores valores de corrente foram encontrados em pacientes LL, que são os que possuem maior carga bacilar, com média dos valores dos picos de oxidação de 232,6 $\mu$ A. Os maiores valores de corrente foram encontrados em pacientes BT que possuem menor carga bacilar (valor da média dos picos = 258,14 $\mu$ A). Valores intermediários foram observados nas formas BB (média dos picos = 242  $\mu$ A) e BL (média dos picos = 238 $\mu$ A).

Com essas análises e com a padronização da técnica com o antígeno PGL-I nativo de concentrações conhecidas foram elaboradas equações de regressão linear com base nos pontos que apresentaram melhor disposição na reta. Essa equação foi utilizada para quantificar a quantidade de bacilos e de antígeno presente nas amostras analisadas pelo biossensor. Assim, foi possível quantificar um limite mínimo de 0,01 $\mu$ g/  $\mu$ L de antígeno e até 1 bacilo presentes nas amostras e um limite máximo de 2.000.000 de bacilos, que foi o maior valor encontrado dentre o grupo de amostras testadas, tendo possibilidade de detecção de valores superiores.

Quanto a composição dos grupos escolhidos para o estudo, as 55 amostras que foram utilizadas no teste eletroquímico, foram selecionadas por método não-aleatório, por cota, dentre as amostras de raspado dérmico de pacientes e contatos suspeitos que haviam sido submetidos a este procedimento rotineiramente para realização da qPCR no período do estudo.

Dessa forma foram analisadas 12 amostras de contatos domiciliares negativos para a hanseníase no exame clínico e 43 amostras de pacientes classificados como BT/PB (2), BT/MB (22), BB (4), BL (6), LL (9), dentre os indivíduos escolhidos, nenhum foi classificado na forma clínica TT e indeterminado. Prevaleram indivíduos classificados como BT/MB 40% do total, seguidos pelos LL 16,3% que são as classificações proporcionalmente predominantes na população cuja amostra foi recrutada, sendo, portanto, descrita tal proporção em estudos anteriores.<sup>7,15,32</sup>

Este estudo mostrou maior prevalência de mulheres portadoras de hanseníase, embora a literatura reporte predomínio de homens diagnosticados com hanseníase quando comparado as mulheres, o que pode estar associado a fatores culturais responsáveis pela subnotificação de casos de mulheres afetadas pela hanseníase em diversos países do mundo.<sup>33</sup>

A maioria dos indivíduos da amostra apresentaram idade entre 20 a 59 anos concordando com os achados de um recente estudo observacional.<sup>34</sup>

Sobre a qPCR, esse trabalho não mostrou diferença entre as médias dos ranks, visto que esse método, independente do material biológico analisado, apresenta elevada sensibilidade na detecção de DNA de *M. leprae* em indivíduos com baixa carga bacilar, tal como ocorreu em alguns contatos domiciliares,<sup>35</sup> o que confirmou o diagnóstico de hanseníase nesses indivíduos.

Os níveis de índice ELISA (IE) anti-PGL-I naqueles pacientes LL e BL foram maiores que nos demais grupos desse estudo, consoante a estudos sobre sorodiagnóstico da hanseníase, confirmando que esse anticorpo IgM é diretamente proporcional à carga bacilar, que é muito alta nesse pólo lepromatoso da doença.<sup>6,36,37,38</sup>

Para validação do biossensor eletroquímico, foi feita a comparação com as técnicas de ELISA anti-PGL-I e qPCR, utilizadas na rotina do Centro de referência para complementar o diagnóstico clínico da hanseníase. Para isso foram calculados os principais indicadores de um teste diagnóstico.

O ELISA anti-PGL-I foi a técnica que apresentou maior especificidade dentre as 3 técnicas, 83,3% já que 10 dos 12 contatos domiciliares foram soronegativos e 16,7% (2/12) dos contatos foram soropositivos, concordando com esse achado, outros estudos encontraram valores de 13,3% e 14% de soropositividade em contatos.<sup>4,39</sup> Porém teve uma sensibilidade de 74,4%, detectando 32 dos 43 pacientes, os 25,6% de pacientes não detectados pertenciam as formas BT e BB e as formas BL e LL foram as mais detectadas chegando próximas de 100% de sensibilidade, assim como em trabalhos anteriores do nosso grupo.<sup>4,6,36,40</sup>

A qPCR foi a que apresentou os menores valores de sensibilidade (72,7%) e acurácia (74,97%) dentre os três testes comparando o grupo total e especificidade de 83,3% mesmo valor encontrado para ELISA. Na literatura, estudo de Martinez 2011<sup>41</sup> encontrou uma sensibilidade de 91,5%, especificidade de 73,3% e acurácia de 82,4% em amostras de analisadas por qPCR RLEP. O menor valor de sensibilidade observado na qPCR nas nossas análises é devido a maior quantidade de pacientes analisados com classificação BT que possuem menor sensibilidade na qPCR comparadas as classificações BL e LL que possuem as maiores sensibilidades chegando a 100% em diversos achados dependendo dos primers analisados.<sup>41,42,43,44</sup>

A qPCR não apresentou positividade entre os contatos domiciliares devido essa técnica ser utilizada no Centro de Referência como suporte para confirmação dos

casos e os contatos qPCR positivos, que apresentam ou não dano neural detectado pela eletroneuromiografia e ELISA positivo ou negativo são tratados.

Já o biossensor eletroquímico obteve os melhores valores de sensibilidade 88,4% e acurácia 81,84% quando comparada as outras duas técnicas, ela conseguiu detectar bacilos em 38 dos 43 pacientes analisados, os 5 pacientes que não foram detectados eram classificados como BT (4) e LL (1). Nas análises de curva ROC, esta técnica também provou ser a melhor dentre os 3 testes para discriminar doença em um grupo de pacientes por apresenta a maior área sob a curva 79%.

A sensibilidade e especificidade combinadas entre 2 testes em série comprovaram que a associação da técnica eletroquímica com qPCR conseguiu obter maiores especificidades (96%) quando comparados outras técnicas associadas, aumentando a certeza de verdadeiros negativos quando o mesmo resultado está presente nos dois testes.

O que chama atenção nesse estudo foi o número relativamente elevado de contatos que foram positivos pela técnica de biossensores (5/12) 41,6% dos contatos analisados, isso pode ter ocorrido devido à alta sensibilidade do teste detectando pequenas quantidade de bacilos presentes em infecções subclínicas, podendo ser explicado pelo lento progresso da doença, alguns desses contatos podem estar com a doença subclínica e / ou desenvolver hanseníase no futuro, o que torna esta técnica uma aliada no diagnóstico precoce da doença. Esses contatos serão monitorados pela equipe do Centro de Referência, com exame clínico pormenorizado, eletroneuromiografia e novos exames ELISA anti-PGL-1 e q PCR de raspado dérmico.

Araújo et al, 2016 encontrou alta positividade em qPCR (RLEP) entre contatos domiciliares, 49% em swabs nasais, 53,8% para biópsias de conchas nasais e 6,7 em amostras de sangue, indicando alta carga bacilar e determinando um alto risco para desenvolvimento da doença nesses indivíduos e que compreendem um grupo reconhecível de indivíduos que contribuem para o risco de transmissão.<sup>7</sup>

Estudo de Carvalho et al., 2018 também comprovou a importância no monitoramento dos contatos domiciliares assintomáticos utilizando qPCR em amostras swab nasal, mostrando que esses contatos são portadores do agente da hanseníase. Essa abordagem tem um significado crítico na ação de prevenção e controle desta doença, uma vez que a avaliação desses indivíduos surge como grande importância na detecção precoce do *M. leprae*.<sup>1</sup>

Sabendo que a hanseníase tem um longo período de incubação e que os sintomas são difíceis de detectar nos estágios iniciais da doença, enfatizamos que a vigilância dos contatos com resultados positivos para qPCR e biossensor eletroquímico são extremamente relevantes já que 6 a 8% dos contatos positivos a qPCR desenvolvem sintomas da hanseníase dentro de dois anos após o diagnóstico do caso de índice.<sup>7,32</sup>

Contatos domiciliares assintomáticos são comprovadamente portadores do bacilo *M. leprae*, que constituem um grupo de alto risco para o desenvolvimento da doença, tendo importante papel na disseminação do bacilo a indivíduos suscetíveis,<sup>1</sup> e aqueles que possuem positividade na qPCR associada a outras técnicas sorológicas e neurofisiológicas tem maior chance de desenvolvimento de neuropatias da hanseníase podendo levar a incapacidades físicas irreversíveis<sup>8</sup>. Com isso, o emprego da estratégia para detecção e / ou identificação precoces de infecção subclínica ligado à quimioprofilaxia certamente contribuirá para prevenção, interrupção da transmissão e controle efetivo da hanseníase.

Finalmente, consideramos que a alta sensibilidade do biossensor eletroquímico associada às técnicas já existentes de qPCR permitem a identificação de um grande número de contatos assintomáticos, podendo melhorar as ferramentas de diagnóstico da hanseníase para detecção de casos de infecções subclínicas e auxiliar no tratamento precoce, visando alcançar um controle efetivo da hanseníase.

### 3.6 Referências

- 1 Carvalho RS, Foschiani IM, Costa MRSN, et al. Early detection of *M. leprae* by qPCR in untreated patients and their contacts: results for nasal swab and palate mucosa scraping. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2018; 37: 1863–1867.  
<https://doi.org/10.1007/s10096-018-3320-9>
- 2 Santos DF, Mendonça MR, Antunes DE, et al. Revisiting primary neural leprosy: Clinical, serological, molecular, and neurophysiological aspects. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2017; 11: e0006086.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006086>
- 3 Lastoria JC, Abreu MAMM. Leprosy: review of the epidemiological, clinical, and etiopathogenic aspects - Part 1. *An. Bras. Dermatol* 2014; 89: 205-218.  
<https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20142450>
- 4 Araújo S, Lobato J, Reis EM, et al. Unveiling healthy carriers and subclinical infections among household contacts of leprosy patients who play potential role in the disease chain of transmission. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2012; 107: 55-59.

- <https://doi.org/10.1590/S0074-02762012000900010>
- 5 Reis EM, Araujo S, Lobato J, et al. *Mycobacterium leprae* DNA in peripheral blood may indicate a bacilli migration route and high-risk for leprosy onset. *Clinical Microbiology and Infection* 2013; 20: 447-52.  
<https://doi.org/10.1111/1469-0691.12349>
  - 6 Fabri ACO, Carvalho APM, Araujo S, et al. Antigen-specific assessment of the immunological status of various groups in a leprosy endemic region. *BMC Infectious Diseases* 2015; 15: 218.  
<https://doi.org/10.1186/s12879-015-0962-4>
  - 7 Araujo S, Freitas LO, Goulart LR, et al. Molecular Evidence for the Aerial Route of Infection of *Mycobacterium leprae* and the Role of Asymptomatic Carriers in the Persistence of Leprosy. *Clin Infect Dis* 2016; 63: 1412-1420.  
<https://doi.org/10.1093/cid/ciw570>
  - 8 Santos DF, Mendonça MR, Antunes DE, et al. Molecular, immunological and neurophysiological evaluations for early diagnosis of neural impairment in seropositive leprosy household contacts. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2018; 12: e0006494.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006494>
  - 9 WHO. World Health Organization. Weekly epidemiological record. *Global leprosy update, 2017: reducing the disease burden due to leprosy* 2018; 93: 445-456.
  - 10 Salgado CG, Barreto JG, da Silva MB, et al. Are leprosy case numbers reliable? *Lancet Infect Dis* 2018; 18:135-137.  
[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30012-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30012-4)
  - 11 Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 1966; 34: 255-73.
  - 12 Brasil - Ministério da Saúde / Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. *Diretrizes para vigilância, atenção e eliminação da Hanseníase como problema de saúde pública: manual técnico-operacional*. Brasília: MS; 2016; 58.
  - 13 WHO. Global Leprosy Strategy 2016–2020. Accelerating towards a leprosy-free world. Geneva: World Health Organization, 2016.
  - 14 Duthie MS, Balagon FM, Maghanoy A, et al. Rapid quantitative serological test for detection of infection with *Mycobacterium leprae*, the causative agent of leprosy. *J Clin Microbiol* 2014; 52: 613-619.  
<https://doi.org/10.1128/JCM.02085-13>
  - 15 Patrocínio LG, Goulart IM, Goulart LR, et al. Detection of *Mycobacterium leprae* in nasal mucosa biopsies by the polymerase chain reaction. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005; 44:311-6.  
<https://doi.org/10.1016/j.femsim.2005.01.002>
  - 16 Martinez AN, Britto CF, Nery JA, et al. Evaluation of real-time and conventional PCR targeting complex 85 genes for detection of *Mycobacterium leprae* DNA in skin biopsy samples from patients diagnosed with leprosy. *J Clin Microbiol*, 2006; 44: 3154-9.  
<https://doi.org/10.1128/JCM.02250-05>
  - 17 Goulart IMB, Cardoso AM, Santos MS, et al. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA in skin lesions of leprosy patients by PCR may be affected by amplicon size. *Arch Dermatol Res* 2007; 299: 267-71.  
<https://doi.org/10.1007/s00403-007-0758-5>

- 18 Araujo S, Goulart LR, Truman R, et al. qPCR-High resolution melt analysis for drug susceptibility testing of *Mycobacterium leprae* directly from clinical specimens of leprosy patients. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2017; 11: p. e0005506.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005506>
- 19 Azevedo MC, Ramuno NM, Fachin LR, et al. qPCR detection of *Mycobacterium leprae* in biopsies and slit skin smear of different leprosy clinical forms. *Braz J Infect Dis* 2017; 21(1): 71-8.  
<https://doi.org/10.1016/j.bjid.2016.09.017>
- 20 Goulart IMB, Goulart LR. Leprosy: diagnostic and control challenges for a worldwide disease. F.I.: 1.596. *Archives of Dermatological Research*, 2008; 300: 269-290.  
<https://doi.org/10.1007/s00403-008-0857-y>
- 21 Roset Bahmanyar E, Smith WC, Brennan P, et al. Leprosy diagnostic test development as a prerequisite towards elimination: requirements from the user's perspective. *PLoS Negl Trop Dis* 2016; 10: e0004331.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004331>
- 22 Cortina ME, Melli LJ, Roberti M, et al. Electrochemical magnetic microbeads-based biosensor for point-of-care serodiagnosis of infectious diseases. *Biosensors and Bioelectronics* 2016; 80: 24–33.  
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.01.021>
- 23 Chen D, Feng H, Li J. Graphene oxide: preparation, functionalization, and electrochemical applications. *Chem. Rev* 2012; 112: 6027–6053.  
<https://doi.org/10.1021/cr300115g>
- 24 Hosseini H, Behbahani M, Mahyari M, et al. Ordered carbohydrate-derived porous carbons immobilized gold nanoparticles as a new electrode material for electrocatalytical oxidation and determination of nicotinamide adenine dinucleotide. *Biosensors and Bioelectronics* 2014; 59: 412-417.  
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.02.046>
- 25 Afonso AS, Goulart LR, Goulart IMB, et al. A promising bioelectrode based on gene of *Mycobacterium leprae* immobilized onto poly(4-aminophenol). *Journal of Applied Polymer Science* 2010; 118: 2921-2928.  
<https://doi.org/10.1002/app.32595>
- 26 Hunter SW, Brennan PJ. A novel phenolic glycolipid from *Mycobacterium leprae* possibly involved in immunogenicity and pathogenicity. *J Bacteriol* 1981; 147: 728-35.
- 27 Silva EA, Iyer A, Ura S, et al. Utility of measuring serum levels of anti-PGL-I antibody, neopterin and C-reactive protein in monitoring leprosy patients during multi-drug treatment and reactions. *Tropical Medicine and International Health* 2007; 12: 1450-8.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2007.01951.x>
- 28 Moura SC, Calado KC, Oliveira MLW, et al. Sorologia PGL-I na hanseníase. *Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical* 2008; 41: 3-5.  
<https://doi.org/10.1590/S0037-86822008000700002>
- 29 Araujo S, Rezende MMF, SOUSA DCR, et al. Risk-benefit assessment of Bacillus Calmette-Guérin vaccination, anti-phenolic glycolipid I serology, and Mitsuda test response: 10-year follow-up of household contacts of leprosy patients. *Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. Revista* 2015; 48: 739-745.  
<https://doi.org/10.1590/0037-8682-0245-2015>

- 30 Acharya S, Dilnawaz F, Sahoo SK. Targeted epidermal growth factor receptor nanoparticle bioconjugates for breast cancer therapy. *Biomaterials* 2009; 30: 5737-50.  
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.07.008>
- 31 Jayapal V, Selvibai G, Mahalakshmi K, Pushkala, Regunath K, Subramanian S. Comparative study of anti-PGL-1, anti-35 kDa and anti-lipoarabinomannan assays for serodiagnosis of leprosy. *Indian J leprosy* 2001; 73(3): 229-37.
- 32 Antunes DE, Araujo S, Ferreira GP, et al. Identification of clinical, epidemiological and laboratory risk factors for leprosy reactions during and after multidrug therapy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2013; 108: 901–908.  
<https://doi.org/10.1590/0074-0276130222>
- 33 Sarkar R, Pradhan S. Leprosy and women. *International journal of women's dermatology* 2016; 2(4): 117-21.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijwd.2016.09.001>
- 34 Zanella LF, Sousa IBA, Barbosa MDS, et al. High detection rate of new cases of multibacillary leprosy in Mato Grosso do Sul, Brazil: an observational study from 2001-2015. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* 2018; 60: e67.  
<https://doi.org/10.1590/s1678-9946201860067>
- 35 Azevedo MC, Ramuno NM, Fachin LR, et al. qPCR detection of *Mycobacterium leprae* in biopsies and slit skin smear of different leprosy clinical forms. *Braz J Infect Dis* 2017; 21(1): 71-8.  
<https://doi.org/10.1016/j.bjid.2016.09.017>
- 36 Naves M M, Ribeiro F A F, Patrocínio JA, et al. Bacterial load in the nose and correlation to the immune response in leprosy patients. *Leprosy Review* 2013; 84: 85-91.
- 37 Kampirapap K, Singtham N. Anti-PGL-1 antibody levels in Thai leprosy patients. *The Southeast Asian J Trop Med and public health* 1996; 27(4): 728-33.
- 38 Jayapal V, Selvibai G, Mahalakshmi K, Pushkala, Regunath K, Subramanian S. Comparative study of anti-PGL-1, anti-35 kDa and anti-lipoarabinomannan assays for serodiagnosis of leprosy. *Indian J leprosy* 2001; 73(3): 229-37.
- 39 Pinho JD, Rivas PMS, Mendes MBP, et al. Presence of *Mycobacterium leprae* DNA and PGL-1 antigen in household contacts of leprosy patients from a hyperendemic area in Brazil. *Genetics and Molecular Research* 2015; 14: 14479-14487.  
<https://doi.org/10.4238/2015.November.18.10>
- 40 Lobato J, Costa MP, Reis EM, et al. Comparison of three immunological tests for leprosy diagnosis and detection of subclinical infection. *Leprosy review* 2011; 82(4): 389-401.
- 41 Martinez, A.N.; Ribeiro-Alves, M.; Sarno, E.N.; Moraes, M.O. Evaluation of qPCR-based assays for leprosy diagnosis directly in clinical specimens. *PLoS Negl. Trop. Dis* 2011; 5: e1354.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001354>
- 42 Bang, P.D.; Suzuki, K.; Phuong le, T.; Chu, T.M.; Ishii, N.; Khang, T.H. Evaluation of polymerase chain reaction-based detection of *Mycobacterium leprae* for the diagnosis of leprosy. *J. Dermatol* 2009; 36: 269–276.  
<https://doi.org/10.1111/j.1346-8138.2009.00637.x>
- 43 Gama RS, Gomides TAR, Gama CFM, et al. High frequency of *M. leprae* DNA detection in asymptomatic household contacts. *BMC Infect Dis* 2018; 18: 153.

- <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3056-2>
- 44 Rudeeaneksin, J, Srisungngam S, Sawanpanyalert P, et al. LightCycler™ real-time PCR for rapid detection and quantitation of *Mycobacterium leprae* in skin specimens. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 2008; 54: 263–270.  
<https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2008.00472.x>

## 4 - Anexos

Patente sob depósito

1/21

### PROCESSO DE MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE DE ELETRODOS PARA CONSTRUÇÃO DE BIOCENSORES ELETROQUÍMICOS

#### [01] Campo da invenção

5 A presente invenção trata-se do desenvolvimento de uma técnica para estabilização, funcionalização e reutilização da superfície de eletrodos *screen-printed* mediante a aplicação de Rodamina 6G (R6G) e criação de um modelo experimental de imunossensor eletroquímico para detecção de micobactérias podendo ser explorados para detecção de outros patógenos. O invento  
10 apresenta características que chamam a atenção de investimentos científicos uma vez que tenta suprir uma dificuldade eminente que é encontrada em eletrodos comerciais, onde a falta de padronização e uniformização da área de trabalho assim como o pouco reconhecimento de amostras biológicas com a superfície tomam o uso desse material pouco viável na detecção e diagnóstico  
15 de doenças. A hanseníase causada pelo *mycobacterium leprae* assim como outras micobactérias foram usadas como modelo para tal aplicação por se tratar de doença infecciosa tropical negligenciada que carece de um diagnóstico diferencial rápido e sensível. O R6G é o primeiro composto orgânico usado como ferramenta para estabilizar, funcionalizar e reutilizar a superfície de eletrodos  
20 comerciais do tipo *screen-printed* a sua utilização podendo ser explorada para detecção de qualquer amostra com constituição proteica e/ou de carboidratos.

#### [02] Estado da Técnica

##### Biossensores

25 O biossensor é um dispositivo integrado e autossuficiente capaz de fornecer informações analíticas, quantitativas ou semi-quantitativas utilizando um elemento de reconhecimento biológico (receptor) que garante a especificidade e produz uma resposta que é traduzida pelo componente físico em um sinal óptico ou elétrico. Ou seja, o objetivo de um biossensor é produzir  
30 um sinal proporcional, em magnitude ou frequência, à concentração do analito

(NAKAMURA, H., KARUBE, I. Current research activity in Biosensors, *Anal. Bional. Chem.* 377: 446-468, 2003).

O receptor consiste em um material de origem biológica, tais como: enzimas, organelas, tecido animal ou vegetal, microrganismo, antígeno ou anticorpo, ácidos nucleicos, entre outros, que é imobilizado em um suporte, conectado a um sensor base (transdutor) que converte o sinal. (TRÉVENOT, D.J.R., TOTH, K., DURST, R. A., WILSON, G. S. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosensor & Bioelectronics.* 16: 121-131, 2001).

Os biossensores podem ser classificados como catalíticos que geralmente utilizam enzimas que são acopladas ao eletrodo de trabalho. Estas têm uma grande atividade aliada a uma elevada especificidade para determinadas espécies, catalisando a formação de produtos eletroativos para serem detectados. Ou de afinidade que baseiam-se na formação de ligações entre o analito e o componente de reconhecimento biológico, utilizando biomoléculas, a ligação depende essencialmente da complementaridade entre o analito e o centro ativo do componente biológico, quer em tamanho como em forma, o que permite uma elevada seletividade e sensibilidade (PATACAS, R. C. Desenvolvimento, caracterização e optimização de um biossensor amperométrico para a determinação de Nitrato baseado em microinterfaces gelificadas. 123 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Porto, 2007).

Dentre os métodos de imobilização, os mais utilizados tem sido: ligação covalente, adsorção física, oclusão em gel ou filme polimérico que podem se formar através de simples imersão ou aplicação de potencial elétrico (eletrodeposição).

As áreas de aplicações dos biossensores são as mais variadas podendo estar presente em campos como saúde humana, veterinária, agricultura, indústria alimentícia, indústria farmacêutica, meio ambiente, defesa da população civil, controle de infecção hospitalar entre outras por apresentam características que os tornam uma ferramenta cada vez atrativa.

3/21

Dentre as características desejáveis ou ideais em relação a um biossensor podemos considerar: seletividade que é a capacidade de distinguir a molécula de interesse dentre as demais presentes na amostra; sensibilidade, o transdutor é capaz de converter um sinal biológico em um sinal elétrico proporcional ao nível de concentração do analito na amostra; estabilidade, tempo em que uma biomolécula permanece com suas características básicas de bioreconhecimento; reprodutibilidade, onde o experimento pode ser repetido por aplicação do mesmo protocolo, obtendo resultados similares ao original; baixo custo e simplicidade de operacionalização (GALLI, A. Desenvolvimento e caracterização de um biossensor bioenzimático imobilizado sobre monocamadas auto-organizadas para determinação de açúcares em alimentos. 143 f. Tese (Doutor em Ciências, Química Analítica) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.)

Os biossensores podem ser classificados de acordo com a biocamada e o transdutor utilizado. Quanto a biocamada podem ser: enzimáticos, que utilizam enzimas como elementos bioreceptores; celulares, que usam microrganismos, especialmente, para o monitoramento ambiental de poluentes e imunossensores, que são baseados na reação imunológica, sendo o antígeno ou anticorpo o receptor imobilizado na superfície do sensor.

De acordo com o transdutor utilizado, o biossensor pode ser classificado como: óptico, que se baseiam em mudanças nas propriedades ópticas das substâncias que podem ser absorção, índice de refração, fluorescência, fosforescência, refletividade e comprimento de onda; piezelétricos, que detectam a massa (relacionada a oscilação da frequência dos cristais piezelétricos); calorimétrico, que usam o calor gerado por reações catalisadoras para medir a concentração do analito e onde o elemento biológico é traduzido em sinal elétrico (DUTRA, R. A. F. Desenvolvimento de biossensores em bioquímica clínica e imunodiagnóstico. Tese de Doutorado: Universidade Federal de Pernambuco, 1999).

30

### Biossensores eletroquímicos

4/21

Biossensores eletroquímicos é provavelmente a maior classe de sensores químicos, sendo utilizados na detecção das mais diversas moléculas, micro-organismos, entre outros. É deste tipo a maioria dos transdutores usados em biossensores comerciais.

5 Podem ser divididos em potenciométrico, amperométrico, voltamétrico, condutimétrico e impedimétrico. Os amperométricos e potenciométricos tem sido os mais utilizados. Os amperométricos baseiam-se nas medidas de intensidade de corrente em uma célula eletroquímica a um potencial fixo, sendo a corrente gerada por reação de oxidação ou redução eletroquímica de espécies  
10 eletroativas na superfície sensível, proporcional à concentração do analito. Nessa técnica, usualmente o potencial de eletrodo de trabalho é mantido constante em relação ao eletrodo de referência. Ao contrário dos amperométricos, os biossensores voltamétricos funcionam com uma variação de potencial para o sistema de detecção até ocorrer a oxidação ou redução do  
15 analito com variação da corrente de pico para mais ou para menos. Nas medidas potenciométricas, a magnitude do potencial medido em correntes quase nulas e é decorrente da diferença de potencial entre um eletrodo indicador e um eletrodo de referência. Os biossensores condutimétricos medem a condutância entre um par de eletrodos metálicos tendo como consequência a produção de espécies  
20 iônicas, resultantes da interação de uma enzima com o analito. Por fim os biossensores impedimétricos são aqueles que utilizam medidas de impedância eletroquímica para a detecção da interação antígeno-anticorpo na superfície modificada do eletrodo. (TRÉVENOT, D.R.; TOTH, K.; DURST, R. A.; WILSON, G. S. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosensor & Bioelectronics*. 16: 121-131, 2001 / MOHANTY, S. P., KOUZIANOS, E. Biosensors: a tutorial review. *IEEE Potentials*, 25( 2): 35–40, 2006).

A detecção eletroquímica parte de dois princípios, direto e indireto. A detecção direta parte dos princípios de oxidação de bases nitrogenadas (no caso  
30 de DNA) e de aminoácidos (no caso de peptídeos e proteínas), na qual a partir de potenciais específicos os valores quantitativos podem proporcionar a

5/21

concentração destas biomoléculas (WO 2012153124 A1 / WO2009045116 A1). A detecção indireta utiliza indicadores eletroquímicos sendo estes passíveis de oxidação e/ou redução também com valores quantitativos proporcionais (direta ou inversamente proporcionais).

5

#### Eletrodos

A escolha da superfície onde irão ocorrer as biorreações (eletrodos) é uma parte fundamental no processo de criação de biossensores. Os sensores eletroquímicos com eletrodos descartáveis tem sido uma opção interessante na aplicação em vários tipos de sistemas, uma vez que podem ser produzidos em massa, a um baixo custo e sem algumas limitações apresentadas pelos eletrodos sólidos, como a falta de repetibilidade da área ativa entre polimentos sucessivos e a dificuldade de regeneração da superfície após o uso acarretando maior custo na execução (NASCIMENTO, V. B. ANGNES, L. Eletrodos fabricados por "silk-screen". *Quím. Nova*. 21(5): 614-629, 1998).

15

Os elétrodos impressos por sistema de serigrafia são chamados de SPE (Screen Printed Electrode) ou silk-screen. Tem sido empregado com grande sucesso por possibilitar a produção em massa com custo extremamente baixo, simplicidade de utilização, alta sensibilidade, seletividade, precisão, estabilidade e respostas rápidas além de poderem ser descartados. Os SPEs consistem em um filme depositado sobre um substrato que vai servir de suporte e fornecer superfície para impressão do eletrodo, geralmente de PVC ou cerâmica de alumina. É importante que o material do substrato seja termicamente e quimicamente inerte, com baixa corrente residual e alta condutividade elétrica capazes de resistirem às gerações de sinais produzidas pelos biossensores. Em seguida são depositadas as tintas sobre o substrato, elas podem ser condutoras e dielétricas. Nas tintas condutoras o material utilizado pode ser pó de metais como ouro, platina, prata, paládio e carbono, as quais estão dispersas no ligante. O carbono tem sido amplamente empregado como matéria prima para confecção de eletrodos devido suas características como elevada inércia química e inércia eletroquímica, esta última numa ampla faixa de potenciais; baixa corrente

30

6/21

residual; alta condutividade elétrica e propiciar uma fácil regeneração da superfície. Em geral, este filme é parcialmente coberto por uma segunda camada de um isolante para definir uma área de contato elétrico numa extremidade e outra área para ser a superfície do eletrodo. (BRAININA, K.H. Z., BOND, A. M.,  
5 Anal. Chem. 87: 2586, 1995 / COOPER, J. M., CASS, A. E. G. Biosensors. 2nd ed. Oxford University Press. United States. 268 f., 2004).

Os eletrodos impressos possuem a vantagem de serem descartáveis, além da facilidade de miniaturização, pois pelo seu formato planar, propicia a sua integração a pequenos dispositivos portáteis. O sistema integrado de três  
10 eletrodos - eletrodo de trabalho (ET); referência (ER) e auxiliar (EA) viabilizam sua utilização em pequenos equipamentos portáteis.

#### Eletrodos modificados

Os eletrodos *screen-printed* apesar de serem aplicados em uma gama de  
15 situações observa-se uma limitação já que na maioria dos casos necessitam de modificação da superfície objetivando principalmente o controle das reações que ocorrem na interface e propiciando maior seletividade para um determinado analito. A grande dificuldade desses eletrodos comerciais é a falta de padronização da área de trabalho mesmo em eletrodos feitos na mesma linha  
20 de produção, assim como a dificuldade de aderência de algumas biomoléculas a superfície da área de trabalho. E apesar de serem descartáveis há um custo maior por não serem reutilizados.

Conceitua-se eletrodos modificados, aqueles que tem imobilizado, em suas superfícies, espécies quimicamente ativas como filme ou camada  
25 monomolecular, multimolecular, iônico ou polimérico objetivando controlar as propriedades físico-químicas da interface eletrodo-solução (EDWARDS, G. A., BERGREN, A. J., PORTER, M. D. Chemically Modified Electrodes. In: ZOSKI, C. G. Handbook of Electrochemistry. Elsevier.. 295-327, 2007).

Essa combinação entre a versatilidade dos eletrodos impressos e a  
30 possibilidade de modificação da sua superfície com reagentes específicos, tem ampliado significativamente as suas aplicações. Existem na literatura eletrodos

7/21

modificados das mais diversas formas como com filme de mercúrio (WANG, J. Decentralized electrochemical monitoring of trace-metals-from disposable strips to remote electrodes – plenary lecture. *Analyst*. 119: 763- 766, 1994) , filme de bismuto (WANG, Z., WANG, H., ZHANG, Z., LIU, G. Electrochemical determination of lead and cadmium in rice by a disposable bismuth/electrochemically reduced graphene/ ionic liquid composite modified screen-printed electrode. *Sensors and Actuators B*. 199: 7-14, 2014), filme de chumbo (BOBROWSKI, A., KROLICKA, A., MACZUGA, M., ZAREBSKI, J. A novel screen-printed electrode modified with lead film for adsorptive stripping voltammetric determination of cobalt and nickel. *Sensors and Actuators B*. 191: 291-297, 2014), nanoparticulas de ouro (ASADOLALLAHI-BABOLI, M., MANI-VARNOSFADERANI, A. Rapid and simultaneous determination of tetracycline and cefixime by mean of gold- nanoparticles-screen-printed gold electrodes and chemometrics tools. *Measurements*. 47: 145-149, 2014), nanoparticulas de oxido de níquel (RAFIEE, B., FAKHARI, A. R. Electrocatalytic oxidation and determination of insulin at nickel oxide nanoparticles-multiwalled carbon nanotube modified screen printed electrode. *Biosensors and Bioelectronics*. 48: 130-135, 2013), filmes poliméricos também são largamente utilizados para este fim (PI 0413769-8 / BR 102016018862-8).

20

### Rodamina

As rodaminas são uma família de químicos orgânicos usados como corantes, conhecidas como fluoronas, é um composto catiônico fluorescente de fórmula  $C_{27}H_{29}ClN_2O_3$ . Esses corantes têm sido muito utilizados como agentes de rastreamento em estudos de água, poluição e pulverização de pesticidas aéreos e como coloração de drogas, cosméticos, têxteis e tintas. Estes compostos são muito utilizados em aplicações biotecnológicas, como microscopia de fluorescência, citometria de fluxo, espectroscopia de fluorescência e ELISA (International Agency for Research on Cancer. Rhodamine B. IARC Monogr., 16: 221-231. 1978).

30

8/21

A Rodamina 6G também é conhecida como Rodamina 590, R6G, Rh6G, Basic Red 1 ou Basic Rhodamine Yellow. Em condições normais de pressão e temperatura, este composto é um sólido cristalino vermelho-púrpura escuro, castanho ou preto. Tem massa molar 479,02 g mol<sup>-1</sup> e uma densidade de 1,26.

- 5 É muito solúvel em água e em diversos solventes orgânicos. Embora muito solúvel, esta forma é bastante corrosiva para todos os metais e ligas, exceto aço inoxidável. Outras fórmulas são menos solúveis, mas menos corrosivas. Tem uma grande foto-estabilidade e um elevado quantum yield de fluorescência (0,95) e apresenta máximo de absorção aos 530 nanômetros. Este corante é
- 10 produzido a partir da condensação de 3-etilamino-p-cresol (3-etilamino-4-metilfenol) com anidrido ftálico, seguido de esterificação com etanol por catálise ácida (GEORGES, J., ARNAUD, N., PARISE, L. Limitations arising from optical saturation in fluorescence and thermal lens spectrometries using pulsed laser excitation: Application to the determination of the fluorescence quantum yield of
- 15 rhodamine 6G. *Applied Spectroscopy*. 50(12): 1505-1511., 1996 / PUBCHEM. Disponível em: <[https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/rhodamine\\_6g#section=Top](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/rhodamine_6g#section=Top)>. Acessado em: 14/08/2018).

- Normalmente corantes catiônicos deste tipo são usados em lasers e como
- 20 moléculas de prova em diversas aplicações biológicas, principalmente por causa de sua baixa toxicidade, eficiência quântica, pequena dependência de fatores ambientais, e suas características fluorescentes não se alteram ao longo de várias horas se sua solução aquosa for continuamente agitada. (ARCOUMANIS, C., MCGUIRK, J.J., PALMA, J.M.L.M. On the use of fluorescent dyes for
- 25 concentration measurements in water flows, ed. *E.i. Fluids*, 1990).

Em genossensores é comum a utilização de compostos químicos como indicadores para comprovar o processo de hibridação seletiva de DNA, RNA e aptâmeros como mostrado na P1 9302052-0.

- Compostos que possuam anéis aromáticos podem ser usados como
- 30 indicadores eletroquímicos por interagirem com DNA através de ligação eletrostática ou de fusão (RICHARDS, A. D., RODGERS, A. *Synthetic*

9/21

metallomolecules as agents for the control of DNA structure. *Chemical Rev.* 36(3): 471-483, 2007).

Muitos estudos relatam o azul de metileno, brometo de etídio e tetrametilbenzidina como indicadores de DNA (ALVES-BALVEDI, R.P., CAETANO, L.P., MADURRO, J.M., BRITO-MADURRO, A.G. Use of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine as new electrochemical indicator of DNA hybridization and its application in genosensor. *Biosens. Bioelectron.* 85: 226-231, 2016 / BALVEDI, R.P.A., CASTRO, A.C.H., MADURRO, J.M., BRITO-MADURRO, A.G., Detection of a Specific Biomarker for Epstein-Barr Virus Using a Polymer-Based Genosensor. *Int. J. Mol. Sci.* 15: 9051-9066, 2014 / TALEATAT, Z., CRISTEA, C., MARRAZZA, G., MAZLOUM-ARDAKANI, M., SANDULECU, R. Electrochemical immunoassay based on aptamer-protein interaction and functionalized polymer for cancer biomarker detection. *J. Electroanal. Chem.* 15: 119-124, 2014).

Nas pesquisas com indicadores eletroquímicos, para indicar o reconhecimento biológico entre proteínas, a BR 1020160195390 evidencia a aplicação do tetrametilbenzidina (4-DMAA) uma vez que é um composto orgânico que pode oxidar, reduzir e interagir com biomoléculas.

O processo da síntese e preparação industrial das rodaminas (B, 3B, 6G e outras) é descrito na EP 0468821 A1 e da Florina, uma rodamina com radioisótopo F18 na US 9101673 B2.

A preparação de soluções concentradas e diluídas, estáveis, aquosas ou solventes orgânicos de R6G ( $C_{28}H_{31}N_3O_3Cl$ , MM 479.02g/mol; solubilidade em água 20 g/l e em metanol 400 g/l) estão contidos em US 20070531413 / WO2007RU00130 / US 6191278 B1 / WO 2005007678 A2.

A patente US 3849065 A descreve como as soluções de corantes como a rodamina estereificada com glicol e/ou derivado de glicol seriam usadas para corar papel.

A patente US 6750357 B1 mostra que a rodamina pode ser utilizada como matéria-prima para a síntese de outros compostos excitáveis por luz em apropriados comprimentos de onda.

10/21

Aplicação de interesse de saúde pública foi a utilização da rodamina no tratamento de células cancerosas, como descrito nas patentes WO2010IL00233 / US2010144854.

A interação de diferentes tipos de rodamina no processo de sequenciamento de DNA, é descrito na US 5368860 A.

Nas análises eletroquímicas a rodamina é utilizada na detecção de íons metálicos (KAMAL, A., KUMAR, N., BHALLA, V., Rhodamine-dimethyliminocinnamyl based electrochemical sensors for selective detection of iron (II). *Sens Act B Chem.* 190: 127-133, 2013 / KIM, H., LEE, D-H., SON, Y-A, Electrochemical Study on Rhodamine  $\beta$ G-Indole Based Dye for HOMO and LUMO Energy Levels. *Text. Coloration Finish.* 25: 7-12, 2013).

A rodamina  $\beta$ G é bastante utilizada em espectroscopia de Ramam como modelo de analito para testar superfícies modificadas como no caso de modificação com nitrato de prata para construção de biossensor para câncer colorretal e em superfícies revestidas com nanoestruturas de ouro devido aos sinais detectáveis de fluorescência emitidos por esse corante (ORSÁGOVÁ, K. Z., ORIŇAK, A., ORIŇAKOVÁ, R., PETRUŠ, O., MACKO, J., RADOŇAK, J., SUKOVSKÁ, L. L., JURAŠEKOVÁ, Z., SMITH, R., STREČKOVÁ, M., KOVAL, K. Electrochemically deposited silver detection substrate for surface-enhanced Raman spectroscopy cancer diagnostics. *J Biomed Opt.* 23(7): 1-11. 2018 / TRAN, M., FALLATAH, A, WHALE, A., PADALKAR, S. Utilization of Inexpensive Carbon-Based Substrates as Platforms for Sensing. *Sensors (Basel).* 27:18(8), 2018).

A rodamina  $\beta$ G é uma interessante molécula de aplicação tecnológica e comumente utilizada em microscopia, citometria de fluxo, espectroscopia, ELISA e sensores de Ramam. Mas não foram encontradas utilizações do corante em biossensores eletroquímicos ou no preparo de superfícies para estabilizar e ligar biomoléculas em eletrodos.

Com essas análises, testou-se a Rodamina  $\beta$ G como modificador da superfície da área de trabalho de eletrodos comerciais *screen-printed* por apresentar anéis aromáticos ligantes de carboidratos e estrutura com afinidade

11/21

a moléculas biológicas como proteínas tomando assim a superfície mais receptiva a elementos biológicos como antígenos e anticorpos sendo usada para preparo de técnicas de sensoriamento biológico e diagnóstico de doenças.

5            Hanseníase

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica causada por *Mycobacterium leprae* acometendo principalmente a pele e os nervos periféricos (WALKER, S.L., LOCKWOOD, D.N.J. *Leprosy. Clin. Dermatol.* 25(2): 165-172, 2007).

10            Em 2015, a Organização Mundial da Saúde registrou 211.973 novos casos de hanseníase, sendo este 28.395 somente no Brasil sendo o segundo país com maior prevalência de hanseníase no mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leprosy elimination. Disponível em: <<http://www.who.int/lepro/en/>>. Acesso em: 01.11.2016). Além disso, a hanseníase é uma doença de notificação compulsória no Brasil e de investigação obrigatória.

O diagnóstico de *M. leprae* é baseado principalmente em testes clínicos realizados no exame dermatoneurológico. (DUTHIE, M.S., HAY, M.N., RADA, E.M., CONVIT, J., ITO, L. Specific IgG antibody responses may be used to monitor leprosy treatment efficacy and as recurrence prognostic markers. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 30: 1257-1265, 2011).

Atualmente testes laboratoriais complementares têm demonstrado uma importante ferramenta no diagnóstico da hanseníase. A técnica de reação em cadeia polimerase (PCR) apresentam uma boa sensibilidade em de hanseníase multibacilar, mas geralmente é pouco sensível (inferior a 50%) em casos de hanseníase paucibacilar. Além disso, a tecnologia de PCR requer equipamentos e infraestrutura de alto custo, são testes para diagnóstico diferencial e complementar e não são utilizados na rotina dos serviços de atenção primária, e sim, nos serviços de referência e em pesquisas (SANTOS, A. R., MIRANDA, A. B., SARNO, E. M., SUFFYS, P. N., DEGRAVE, W.M. Uso de PCR mediada por

12/21

amplificação de *Mycobacterium leprae* DNA em diferentes tipos de amostras clínicas para o diagnóstico da lepra. *J. Med. Microbiol.* 39: 298-304, 1993).

Com isso existe um interesse crescente no desenvolvimento de métodos portáteis, simples, rápidos e precisos para a detecção desses patógenos.

5 Métodos que envolvem a detecção eletroquímica têm mostrado novas possibilidades para o diagnóstico de doenças infecciosas ou outras doenças.

Devido a busca por novas técnicas de diagnóstico para doenças infecciosas como a hanseníase e tuberculose utilizou-se então essas doenças como modelo experimental para testar a utilização dos eletrodos modificados com rodamina 6G.

### [03] Descrição e detalhamento dos componentes da invenção

Eletrodos comerciais *screen-printed* são amplamente utilizados na criação de sensores eletroquímicos, porém seu uso é limitado devido falta de padronização da área de trabalho e pouco reconhecimento com amostras biológicas necessitando assim de agentes modificadores. Visando proporcionar um modificador de superfície de baixo custo, baixa toxicidade, eficiente, estável e com afinidade a moléculas biológicas, a invenção apresenta a modificação da superfície transdutora de um eletrodo comercial tipo *screen-printed* com rodamina 6G, um corante capaz de estabilizar e homogeneizar a superfície e aumentar a área ativa dos eletrodos garantindo maior passagem de elétrons e maior reconhecimento biológico por possuir anéis de benzeno em sua estrutura que interajam com proteínas, DNA e RNA através de ligação eletrostática ou de fusão capacitando o biossensor no reconhecimento e diagnóstico dessas amostras.

Nesta plataforma, utilizou-se anticorpos específicos para algumas bactérias imobilizados sobre a superfície transdutora de um eletrodo comercial tipo *screen-printed* modificado com rodamina 6G como componente biológico de reconhecimento, porém, cabe ressaltar que esta aplicação serve como exemplo da viabilidade de seu uso, não sendo exclusivamente para este fim e sim poderá ser utilizado em diagnóstico de outras doenças e/ou reconhecimento de

13/21

biomoléculas que possuam proteínas ou seus fragmentos biológicos ou sintéticos, antígenos, anticorpos, peptídeos, enzimas DNA, RNA e aptâmeros.

A aplicação resulta na construção de um imunossensor que utiliza um eletrodo de grafite tipo *screen-printed* DRP 110 como material condutor e corante rodamina 6G como modificador da área de trabalho e análises eletroquímicas acompanhando a variação dos sinais por voltametria de pulso diferencial, voltametria cíclica ou outra técnica eletroquímica apropriada, do pico de oxidação ou redução da ligação de reconhecimento específica entre sonda e alvos.

Para os ensaios de especificidade e sensibilidade do imunossensor modificado foram utilizados anticorpos específicos, seus respectivos antígenos nativos ou miméticos, cultura de bactérias e amostras clínicas de raspado dérmico de pacientes. No entanto, a presente invenção não se restringe apenas à utilização para essas amostras e sim para imunossensores de maneira geral.

O eletrodo utilizado deve ser de um material preferencialmente condutor e, apresentar inércia eletroquímica na faixa de -0,4 V à +1,4 V (versus Ag/AgCl ou Ag), tal como o grafite, carbono vítreo, pasta de carbono, diamante, ouro, platina ou até mesmo combinações destes materiais. Estes materiais e os compostos biológicos de reconhecimento também podem estar incorporados aos materiais nanotecnológicos como filmes poliméricos, grafeno, nanotubos de carbono e nanopartículas, visando o aumento da condutividade e melhoramento de sinais eletroquímicos.

#### [04] Descrição das figuras

Para melhor compreensão das características da presente invenção que utiliza a rodamina 6G como modificador da superfície transdutora de um eletrodo comercial tipo *screen-printed* resultados gráficos exemplificadores são apresentados os quais representam uma forma de produção do imunossensor para diagnóstico de micobactérias como hanseníase e tuberculose a título de exemplo da aplicação.

30

#### Interação da Rodamina 6G com a superfície dos eletrodos

14/21

A FIGURA 1 ilustra a varredura de voltametria cíclica (VC) (FIG. 1A) e voltametria de pulso diferencial (VPD) (FIG. 1B) para três eletrodos diferentes modificados com rodamina 6G (4,5 e 6) e os mesmos eletrodos antes da adsorção deste componente (1, 2 e 3). Observa-se que nas voltametrias dos eletrodos sem modificação ocorreu uma grande variação, mais de 50uA, na corrente de oxidação da VPD e da VC e nesta o potencial também variou de 0,2 a 0,4V. Enquanto os eletrodos modificados com rodamina 6G além de aumentar significativamente os picos das correntes na VC e na VPD indicando maior passagem de elétrons, as correntes e potenciais desses eletrodos modificados permaneceram bem homogêneas entre as análises voltamétricas entre áreas de eletrodos diferentes. A rodamina 6G tem uma adsorção eficiente no carbono, possivelmente devido a interações de *Van der Waals* entre o anel de benzeno planar e a superfície do eletrodo. Provando assim que essa modificação foi útil para homogeneizar, padronizar e aumentar a condutividade da superfície transdutora dos eletrodos preparando-os assim para aplicação das amostras.

#### Investigação da concentração de rodamina 6G

A FIGURA 2 mostra a adsorção de diferentes concentrações de rodamina 6G na superfície dos eletrodos a fim de estudar sua interação para escolha da melhor diluição a ser usada nos próximos testes. A FIG 2A e B apresentam voltamogramas cíclicos e de pulso diferencial para as seguintes diluições de rodamina: (1) 50µg, (2) 100µg, (3) 500µg, (4) 1mg, (5) 5mg, (6) 10mg, (7) 50mg, (8) 100mg. Analisando a VC observamos que conforme aumenta a concentração de rodamina a corrente de oxidação e redução também aumenta, porém, o desenho das curvas voltamétricas são distorcidas e os picos começam a ficar mais espaçados a partir da concentração de 1mg provavelmente pelo acúmulo e saturação da rodamina na superfície dos eletrodos. Na VPD FIG 2B o pico de oxidação decresce com a concentração acima de 500µg novamente comprovando que essa é a concentração limite para modificar de forma eficiente os eletrodos e concentrações acima dessa margem saturam a superfície transdutora dificultando a ligação das sondas e dos alvos. A FIG 2C apresenta

15/21

uma tabela com os valores das velocidades de varredura dos picos das correntes de oxidação em voltametria cíclica para as diferentes concentrações de rodamina estudadas. Esses valores foram utilizados para formulação da equação de Randles-Sevcik que mede a área ativa e a passagem de elétrons da superfície transdutora, mostrando assim que a modificação dos eletrodos com rodamina aumenta em até 99% da área ativa em relação a eletrodos não modificados.

#### Deteção de antígenos com eletrodos modificados

Para construção do bioeletrodo foi imobilizado o anticorpo específico para antígenos de *Mycobacterium leprae* Anti-PGL-1 na superfície dos eletrodos modificados com rodamina 6G e testados o reconhecimento com alguns antígenos miméticos, sintéticos e nativos que reconhecem especificamente essa sonda. Na FIGURA 3A foram realizadas voltametria cíclica para determinação da diferença entre a ligação do anticorpo com o antígeno nativo PGL-1 (curva 1), anticorpo com antígeno mimético M3R (curva 5) e anticorpo sem antígeno de reconhecimento (curva 3), a curva 2, eletrodo sem modificação e a curva 4, eletrodo modificado com rodamina mas sem os alvos serviram como linhas base. A FIG 3B apresenta o gráfico de barras da mesma análise anterior com os valores das correntes dos picos de oxidação da ligação em cada eletrodo no potencial de 0,25V. Analisando os picos de corrente nesse potencial é possível verificar a diferença quando há ligações do anticorpo com os antígenos e quando há ausência de reconhecimento. Na FIGURA 3C foram feitas análises em voltametria de pulso diferencial com o mesmo anticorpo anti-PGL-1 reconhecendo outros antígenos específicos para a comparação. A CURVA 1 representa a ligação do anticorpo com antígeno nativo PGL-1, na CURVA 2 o anticorpo está sem antígeno de reconhecimento, na CURVA 3 o anticorpo está reconhecendo o antígeno LAM de *M. leprae*, na CURVA 4 a ligação é com antígeno PGL-1 sintético, na CURVA 5 com antígeno mimético de PGL-1, o M3R e na CURVA 6 o anticorpo reconheceu outro antígeno mimético, MPML14. Na FIGURA 3C as mesmas ligações foram analisadas pelo gráfico de barras.

16/21

Podemos concluir com essas análises que cada tipo de antígeno possui um reconhecimento específico e que todas as curvas diferem da curva sem o alvo de reconhecimento, mostrando a especificidade do bioeletrodo construído.

#### 5 Investigação da limpeza e reutilização do bioeletrodo

A FIGURA 4 mostra a limpeza e reutilização do bioeletrodo modificado com rodamina 6G mesmo após a adsorção do anticorpo e dos antígenos. Na FIG. 4A temos os voltamogramas cíclicos dos eletrodos modificados imobilizados com o anticorpo Anti-PGL-1 com antígeno PGL-1 nativo (curva 1), sem antígeno de reconhecimento (curva 2) e com antígeno mimético M3R (curva 3). Após essas leituras e diferenciação das curvas, os eletrodos foram lavados com álcool e reutilizados para novas adsorções. Na FIG. 4B os eletrodos que foram lavados e voltaram a sua linha base original foram modificados novamente com rodamina 6G, nota-se que as curvas que eram diferentes na figura anterior devido as imobilizações ficaram homogêneas comprovando a limpeza do eletrodo com álcool e homogeneidade da superfície com a deposição da rodamina. Os eletrodos modificados pela segunda vez foram então imobilizados com o mesmo anticorpo, mas a ordem de adsorção dos antígenos foi modificada. No eletrodo que não havia sido imobilizado com antígeno, no segundo teste foi imobilizado com antígeno PGL-1 nativo (FIG. 4C curva 1), o que havia sido imobilizado com antígeno M3R, na segunda leitura não foi adicionado antígeno (FIG. 4C curva 2) e o eletrodo que fora adsorvido antígeno PGL-1 nativo na primeira modificação, foi adicionado o antígeno M3R na segunda imobilização. Mesmo depois de lavado e realizadas imobilizações em eletrodos diferentes, o bioeletrodo manteve a capacidade de diferenciação dos antígenos com os picos de oxidação e redução se mantendo bem próximos dos eletrodos modificados e imobilizados pela primeira vez. Esse estudo demonstrou que eletrodos modificados com rodamina 6G possuem a capacidade de serem limpos e reutilizados mesmo após a adsorção de sondas e alvos, já que estas se ligam no composto químico adsorvido anteriormente e não diretamente na superfície do eletrodo e quando o bioeletrodo modificado é lavado com algum solvente

17/21

orgânico, o álcool no caso desse teste, consegue desfazer as ligações do anel de benzeno entre a rodamina e o carbono da superfície do eletrodo lavando junto todo material biológico que havia sido depositado sobre a rodamina.

#### 5 Protótipo para diferenciação entre amostras clínicas

Na FIGURA 5 foram utilizadas amostras clínicas de raspado dérmico de pacientes e contatos suspeitos de hanseníase. Estes foram imobilizados da mesma forma em eletrodos de carbono modificados com rodamina 8G e anticorpo anti-PGL-1. As CURVAS 1 referem-se à imobilização com raspado  
10 dérmico positivo e as CURVAS 2 com raspado dérmico negativo. Observa-se que as curvas das amostras positivas têm o pico da corrente de oxidação e redução menores do que as amostras negativas, isso porque quando há ligação anticorpo-antígeno dificulta a passagem de elétrons na superfície do eletrodo, e quando não há ligação específica a transferência de elétrons é maior. Na FIG.  
15 5A o teste foi realizado em voltametria cíclica com  $V = 200 \text{ mV.s}^{-1}$  e apresentou diferenciação entre a corrente dos picos de oxidação da amostra positiva e negativa de  $88 \mu\text{A}$ . Já na FIG. 5B a velocidade de varredura foi aumentada para  $500 \text{ mV.s}^{-1}$  e a diferenciação entre as amostras também aumentou para  $141 \mu\text{A}$  nos picos de oxidação. Na FIG 5C as curvas de varredura foram analisadas em  
20 voltametria de pulso diferencial e a diferença entre as correntes de oxidação das amostras positiva e negativa foram ainda mais significativas ( $308 \mu\text{A}$ ).

#### Estudo com outras micobactérias

A FIGURA 6 apresenta voltametrias cíclicas (A e B) e voltametria de pulso  
25 diferencial (C) com o antígeno específico para tuberculose Anti-LAM imobilizado no eletrodo modificado da mesma forma dos testes anteriores. Nas CURVAS 1 os eletrodos foram incubados com cultura de TB (amostras positivas) enquanto as CURVAS 2 não contém nenhum alvo (controle negativo). Observa-se uma diferença significativa entre os picos das correntes de oxidação das amostras  
30 positivas e negativas,  $74 \mu\text{A}$  na FIG. 6A,  $139 \mu\text{A}$  na FIG. 6B e  $262 \mu\text{A}$  na FIG. 6C. Os resultados foram similares aos da FIGURA 5 com as amostras clínicas de

18/21

raspado dérmico devido à mesma forma de reconhecimento do anticorpo específico e o antígeno com a rodamina 6G imobilizada nos bioeletrodos, confirmando assim que essa forma de modificação é útil no diagnóstico de outras doenças e/ou reconhecimento de diversas biomoléculas.

5

### [05] A invenção

#### Preparo do bioeletrodo

O eletrodo utilizado foi do tipo *screen-printed* de grafite, consiste em um eletrodo de trabalho (4 mm de diâmetro), contra eletrodo e eletrodo de referência.

10 (Ref. DRP 110)

Na superfície do eletrodo de trabalho foram aplicados 2 $\mu$ L a 4  $\mu$ L de rodamina 6G espalhado por toda área (testado em diferentes concentrações), a adsorção física foi feita entre 10 a 20 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, o eletrodo foi conectado ao receptor do potenciostato PalmSens 3,

15 (Compact Electrochemical Interfaces) e a eletrodeposição foi realizada em três medições consecutivas em voltametria cíclica ( $V= 10$  a 200  $mV.s^{-1}$ ) utilizando 50 a 120  $\mu$ L de ferrocianeto de potássio 1 mM a 5mM / KCl 0,1M como eletrólito suporte. Após essa etapa o eletrodo foi lavado com 100  $\mu$ L de água destilada e em seguida secado em temperatura ambiente.

20

Eletrodos sem modificação também foram medidos nas mesmas condições anteriores para determinar a diferença entre eles.

#### Concentrações de rodamina 6G

Para definir qual a melhor concentração de rodamina a ser utilizada no preparo do eletrodo foram testadas variações de 100 $\mu$ g a 100mg de corante diluídos em água ultrapura. Foram realizadas voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial com diferentes velocidades de varredura para determinação da área ativa do eletrodo através da equação de *Randles-Sevcik*. Os testes de reconhecimento biológico do anticorpo também foram realizados em todas as

30 concentrações.

19/21

#### Deteção de antígenos na superfície do eletrodo modificado

Para a formulação da linha base medições de voltametria de pulso diferencial e voltametria cíclica em diferentes velocidades de varredura no eletrodo *screen-printed* modificado e sem modificação conectados a um potenciostato PalmSens 3, (Compact Electrochemical Interfaces) foram obtidas, utilizando 50 a 120  $\mu\text{L}$  de ferrocianeto de potássio de 1 mM a 5mM / KCl 0,1M como eletrólito suporte.

Em eletrodos modificados com rodamina 6G foram aplicados na superfície de trabalho 2 a 10  $\mu\text{L}$  do anticorpo específico de *M. leprae* (anti-PGL-1) ou específico de *M. tuberculosis* (anti-LAM de TB) ou outro anticorpo específicos de micobacterias e incubados a temperatura entre 25 a 37° durante 5 a 50 minutos. Posteriormente foram incubados com 2 a 10  $\mu\text{L}$  de antígeno específico aos anticorpos nativo ou sintéticos por mais 5 a 50 min de 25 a 37° e lavados com água destilada. As leituras foram realizadas por voltametria de pulso diferencial e voltametria cíclica em potenciostato portátil utilizando o ferrocianeto de potássio como eletrólito suporte.

#### Limpeza e reutilização de eletrodos

Foi investigada uma técnica para limpeza dos eletrodos usados e modificados com a rodamina, sabendo que ela é muito solúvel em solventes orgânicos, utilizou-se o álcool etílico que é capaz de desfazer as ligações desse corante com o carbono da superfície dos eletrodos. Os eletrodos usados após a adsorção das sondas e alvos foram imersos em álcool por 5 a 30 min e posteriormente lavados com água destilada e secados a temperatura ambiente. A rodamina 6G foi novamente eletrodepositada nesses eletrodos preparando-os para reuso.

#### Deteção em amostras clínicas

Foram usados raspados dérmicos de pacientes e contatos suspeitos de hanseníase. A técnica tipo *sít skin* parte do princípio da coleta de amostras contaminadas de lobo de orelha, cotovelos, joelhos e a de lesão ativa se estiver

20/21

presente que são armazenadas em tampão fosfato. Os raspados foram previamente quantificados por PCR em tempo real e suas concentrações já eram conhecidas assim como amostras classificadas como negativas que foram usadas como controle.

- 5 O anticorpo específico de *M. leprae* (anti-PGL-1) foram acoplados a nanopartículas magnéticas  $\text{COFe}_2\text{O}_4$  com tratamentos para a bioconjugação. Após este processo as amostras de raspado positivos e negativos foram incubadas ao anticorpo conjugado por 30 min a 2 horas em 37 a 45°C. O conjugado antígeno-anticorpo foi lavado com PBS1X em estante magnética e a
- 10 parte presa ao magneto foi ressuspensa e aplicada 2 a 20  $\mu\text{L}$  na superfície da área de trabalho do eletrodo modificado com rodamina 8G e incubados a temperatura entre 25 a 37° durante 5 a 50 minutos. As análises foram feitas por medições de voltametria de pulso diferencial e voltametria cíclica em diferentes velocidades de varredura no eletrodo em potenciostato portátil e 50 a 120  $\mu\text{L}$  de
- 15 ferrocianeto de potássio de 1 mM a 5mM / KCl 0,1M foi utilizado como eletrólito suporte.

#### Detecção de outras micobactérias

- Foi realizado teste com os eletrodos modificados com rodamina 8G para
- 20 detectar outro tipo de micobactéria, o *M. tuberculosis*. Para isso foi utilizado o anticorpo específico desse patógeno Anti-LAM de tuberculosis que foi imobilizado da mesma forma dos testes anteriores, e para o reconhecimento específico foi adsorvido posteriormente uma amostra de cultura de tuberculose em meio TLN (amostra positiva) e como controle negativo foi adsorvido somente
- 25 o meio TLN sem nenhum tipo de patógeno e incubados a temperatura entre 25 a 37° durante 5 a 50 minutos. As análises foram feitas por medições de voltametria de pulso diferencial e voltametria cíclica em diferentes velocidades de varredura no eletrodo em potenciostato portátil e 50 a 120  $\mu\text{L}$  de ferrocianeto de potássio de 1 mM a 5mM / KCl 0,1M foi utilizado como
- 30 eletrólito suporte.

21/21

Proposta para uso em campo

kits liofilizados contendo anti-PGL1/anti-LAM ou outros anticorpos específicos para micobactérias acoplados ou não a nanopartículas magnéticas serão disponibilizados para posterior aglutinação com diversos tipos de amostras biológicas a serem testadas em campo que serão aplicadas em eletrodos já preparados com rodamina 6G o que facilita e agiliza o processo de diagnóstico *in house*.

**[06] Conclusões**

A presente invenção mostra que a rodamina 6G funcionou como um versátil modificador da superfície transdutora de eletrodos comerciais do tipo *screen-printed*, ela foi capaz de estabilizar e funcionalizar a área de trabalho, isso, porque adsorve facilmente em carbono grafite através do anel de benzeno, e também liga-se as proteínas, e outras moléculas biológicas por meio de ligações de hidrogênio, e sua ligação se desfaz facilmente quando lavado com álcool etílico tornando o biossensor reutilizável. O Imunossensor com superfície modificada promoveu a detecção de antígenos quando usados anticorpos específicos como alvo e diferenciou amostras de raspado dérmico de pacientes com hanseníase dos contatos sem a doença. Apresentou vantagens inerentes à sua rapidez no diagnóstico destas patogenias, aplicabilidade, especificidade, sensibilidade, estabilidade, seletividade e baixo custo. Exemplificando assim que este tipo de sensor pode ser utilizado na detecção de biomoléculas que possuam proteínas ou seus fragmentos biológicos ou sintéticos, antígenos, anticorpos, peptídeos, enzimas DNA, RNA e aptâmeros, como analitos ou como elemento de reconhecimento biológico.

FIGURA 1

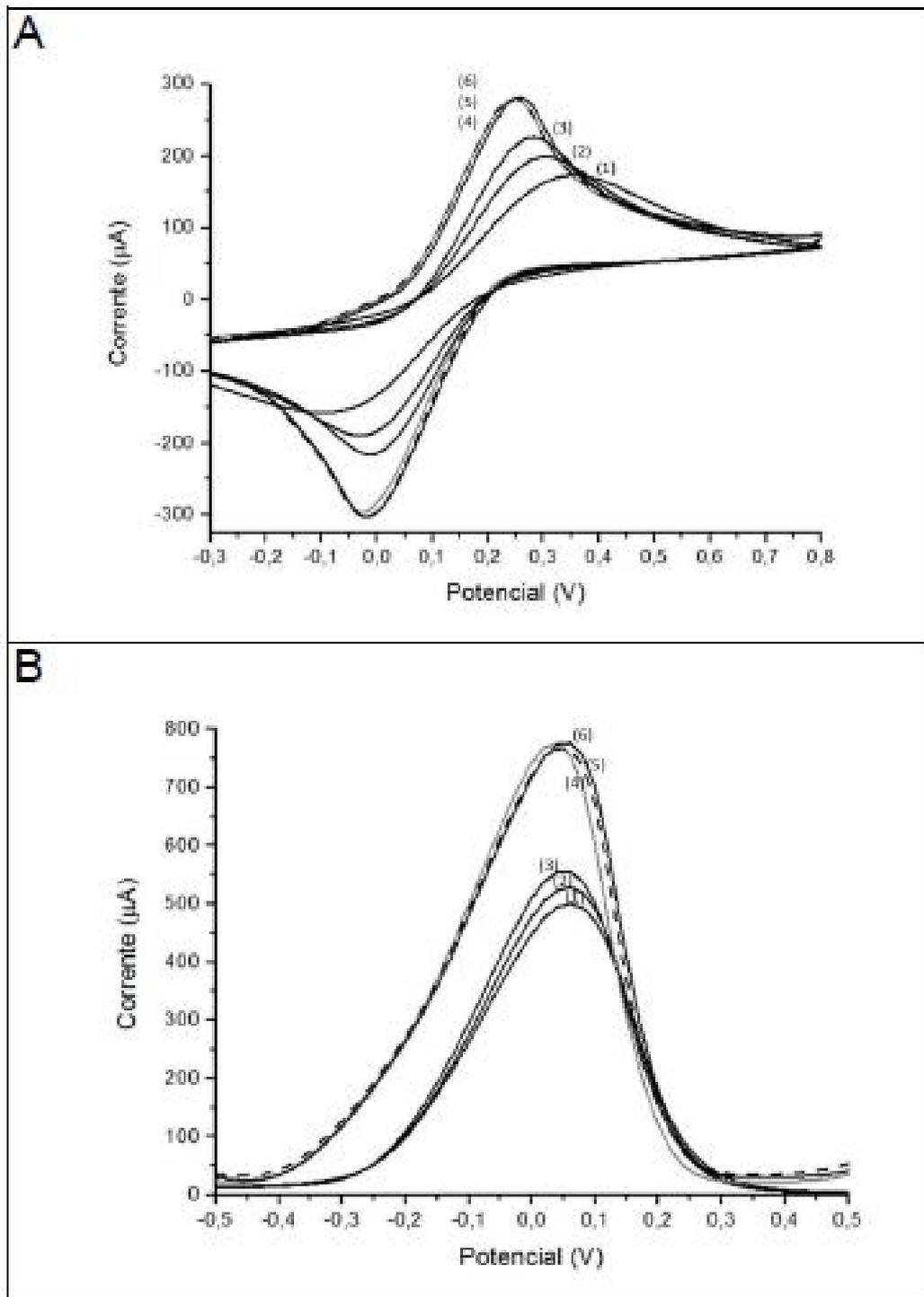
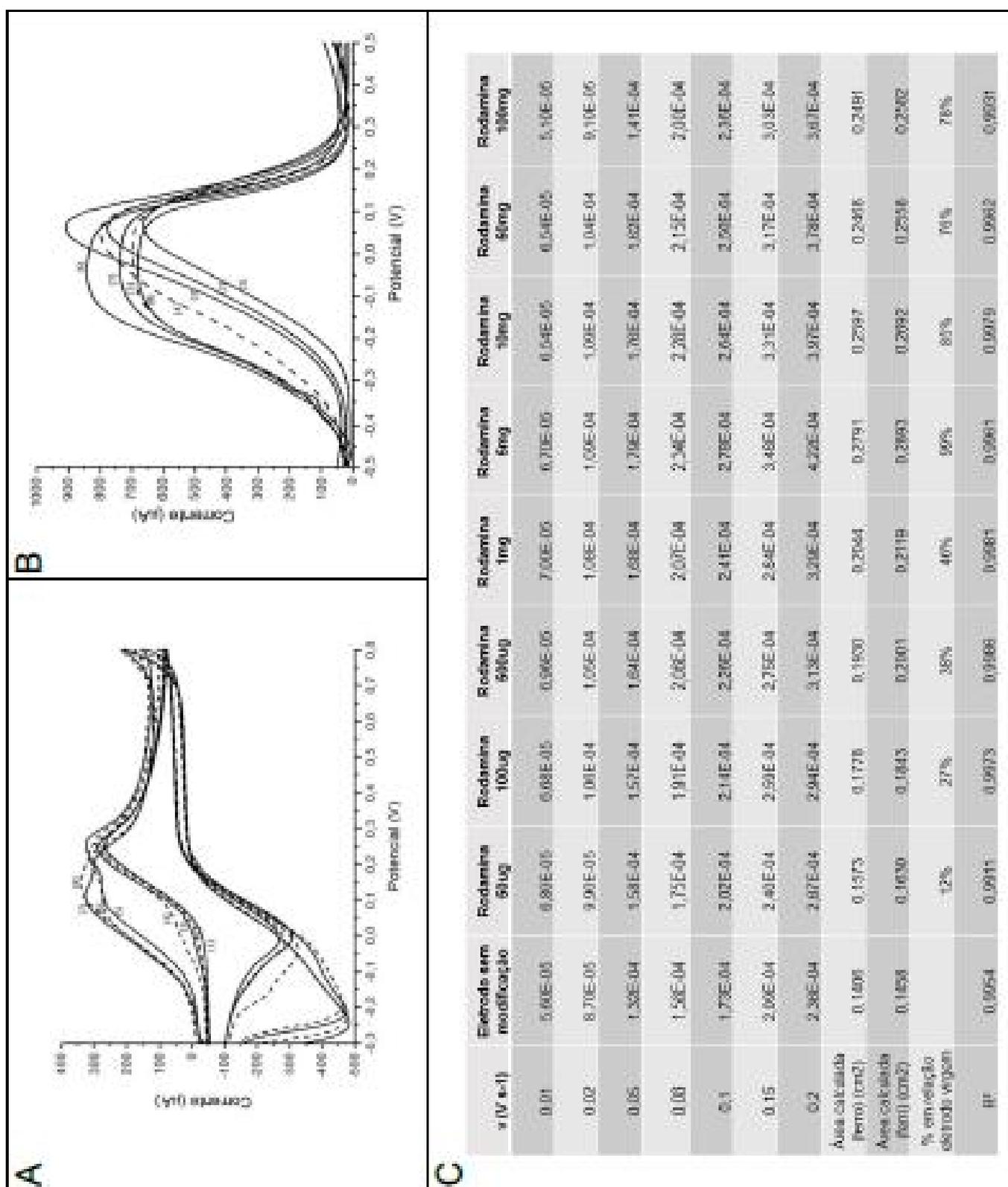


FIGURA 2



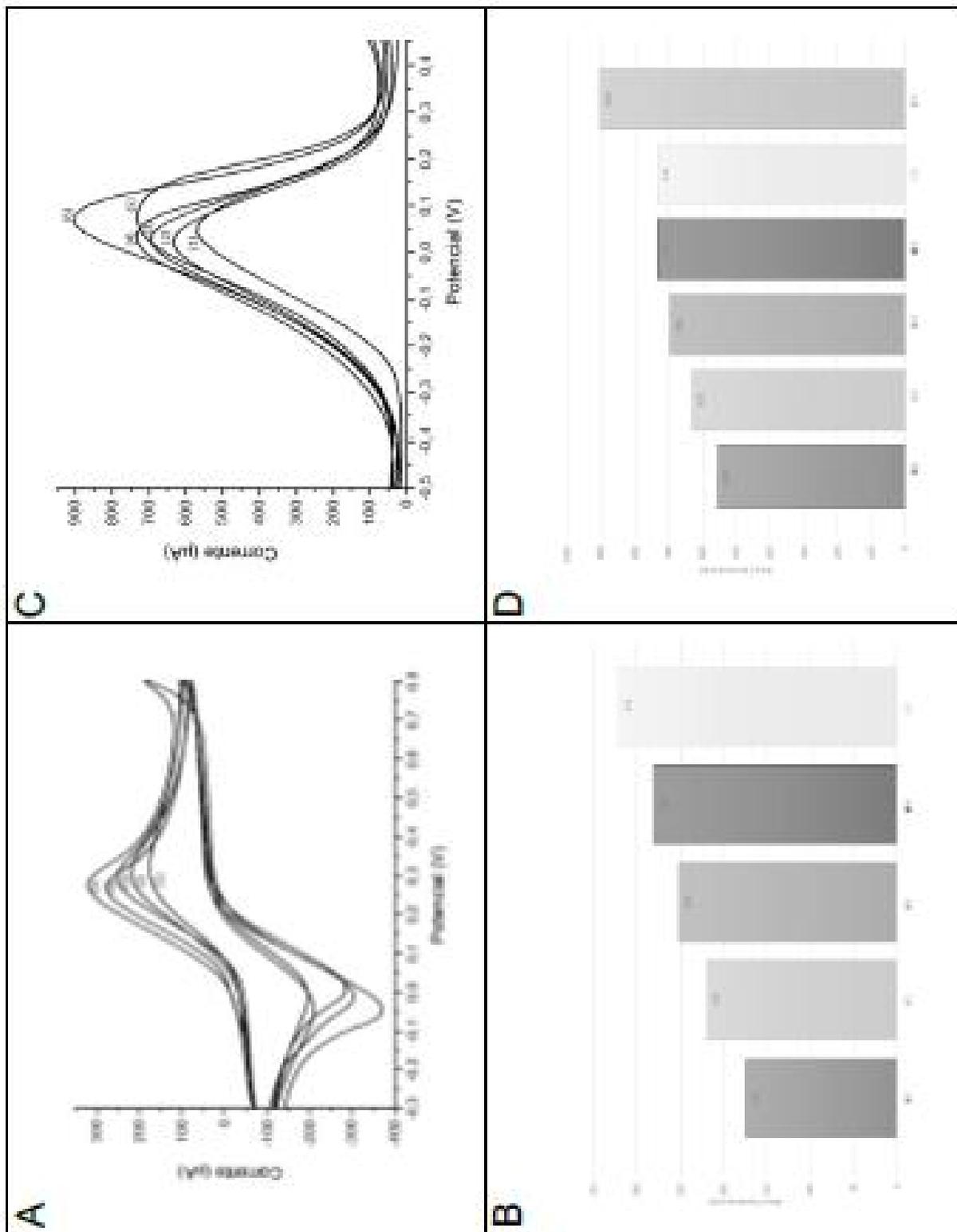
**FIGURA 3**

FIGURA 4

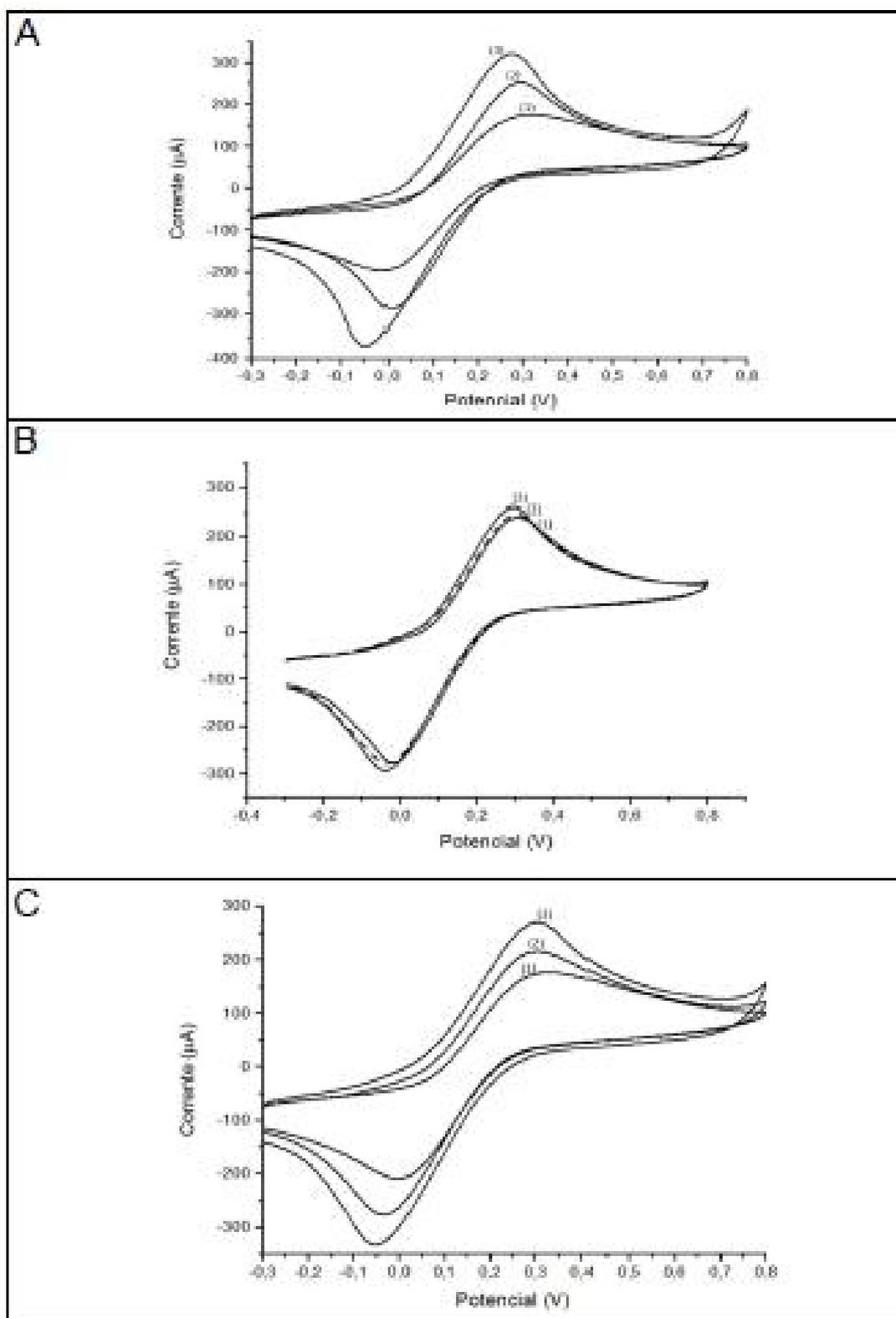


FIGURA 5

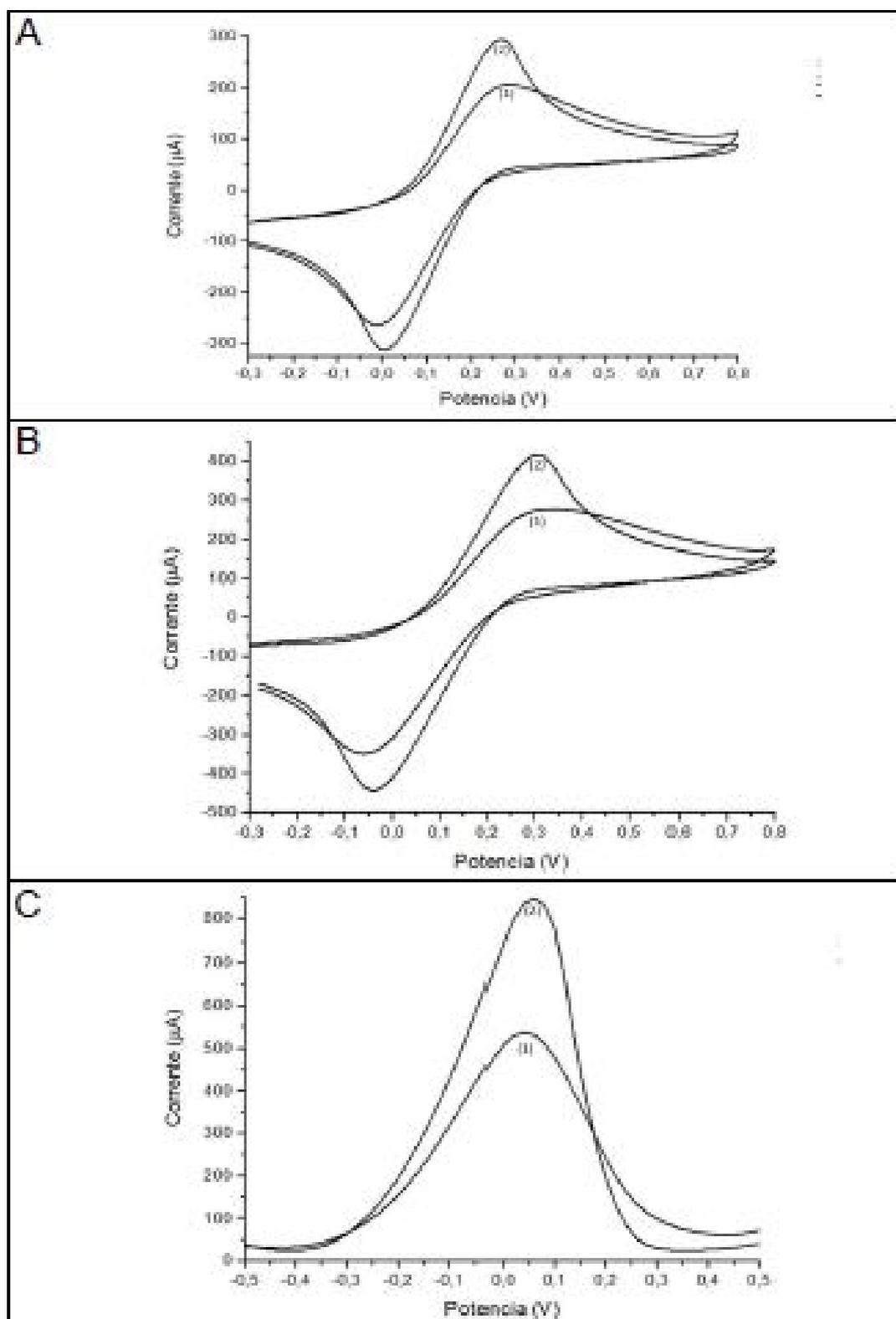
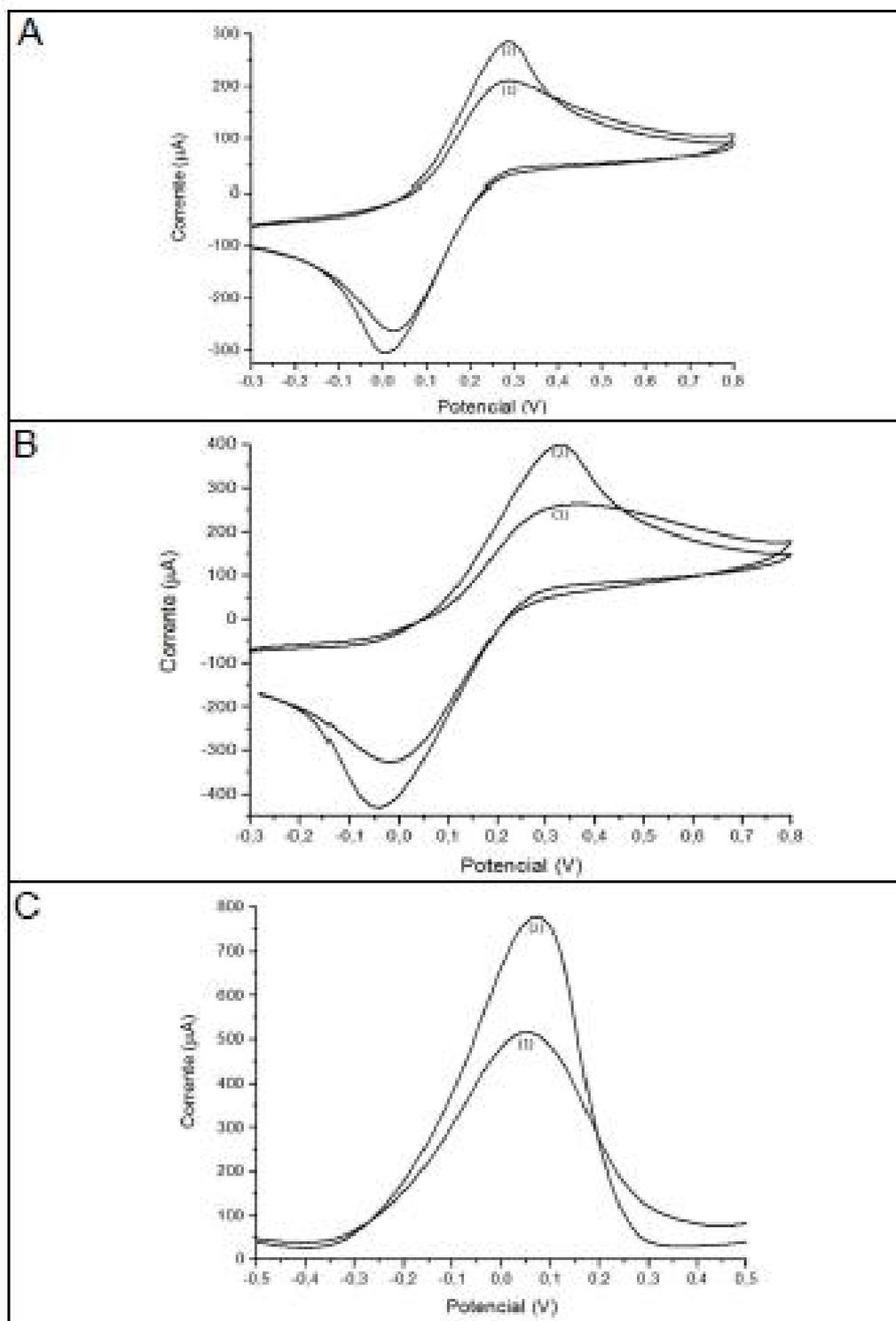


FIGURA 6



## REIVINDICAÇÕES

### 1) PROCESSO DE MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE DE ELETRODOS PARA CONSTRUÇÃO DE BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS

caracterizado por compreender as seguintes etapas:

- a) na superfície do eletrodo de trabalho foram aplicados 2  $\mu$ L a 4  $\mu$ L de rodamina 6G espalhado por toda área;
- b) a adsorção física foi feita entre 10 a 20 minutos à temperatura ambiente;
- c) em seguida, o eletrodo foi conectado ao receptor do potenciostato PalmSens 3, (Compact Electrochemical Interfaces) e a eletrodeposição foi realizada em três medições consecutivas em voltametria cíclica ( $V=10$  a  $200$   $mV.s^{-1}$ ) utilizando 50 a 120  $\mu$ L de ferroferricianeto de potássio 1 mM a 5mM / KCl 0,1M como eletrólito suporte;
- d) após essa etapa o eletrodo foi lavado com 100  $\mu$ L de água destilada e em seguida secado em temperatura ambiente.

### 2) PROCESSO DE MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE DE ELETRODOS PARA CONSTRUÇÃO DE BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS

de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ser composto por eletrodo de grafite (*screen-printed* DRP 110 ou outros eletrodos de trabalho preferencialmente de material condutor, apresentando inércia eletroquímica na faixa de  $-0,4V$  e  $+1,4V$  (*versus* Ag/AgCl ou Ag), tal como carbono vítreo, pasta de carbono, diamante, ouro, platina, podendo ser de combinação de materiais nanotecnológicos como filmes poliméricos, grafeno, nanotubos de carbono e nanopartículas na superfície dos eletrodos assim como nas sondas usadas para reconhecimento.

### 3) PROCESSO DE MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE DE ELETRODOS PARA CONSTRUÇÃO DE BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS

de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por usar a rodamina 6G em concentrações que variam de 100 $\mu$ g a 100mg diluídas em solvente orgânico, podendo ser adicionados surfactantes, compostos químicos ou materiais

nanotecnológicos para melhorar a ligação com a superfície dos eletrodos e com as biomoléculas.

**4) PROCESSO DE MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE DE ELETRODOS PARA CONSTRUÇÃO DE BIOCENSORES ELETROQUÍMICOS** de acordo com a reivindicação 1, caracterizados por usar anticorpos específicos e seus respectivos antígenos nativos, miméticos, cultura de bactérias e amostras de raspados de pacientes. Não restringindo apenas as amostras testadas e sim para imunossensores de maneira geral utilizando biomoléculas que possuam proteínas ou seus fragmentos biológicos ou sintéticos, antígenos, anticorpos, peptídeos, enzimas DNA, RNA e aptâmeros, como analitos ou como elemento de reconhecimento biológico.

**5) PROCESSO DE MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE DE ELETRODOS PARA CONSTRUÇÃO DE BIOCENSORES ELETROQUÍMICOS** de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por tornar o biossensor reutilizável através da lavagem do eletrodo modificado com solvente orgânico em diferentes concentrações.

**6) PROCESSO DE MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE DE ELETRODOS PARA CONSTRUÇÃO DE BIOCENSORES ELETROQUÍMICOS** de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ser a modificação de eletrodos e detecção de materiais biológicos através da análise eletroquímica, acompanhando a variação dos sinais por voltametria de pulso diferencial, voltametria cíclica, voltametria de onda quadrada ou outra técnica eletroquímica apropriada, do pico de oxidação ou redução da ligação de reconhecimento específica entre sonda e alvos.

**7) PROCESSO DE MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE DE ELETRODOS PARA CONSTRUÇÃO DE BIOCENSORES ELETROQUÍMICOS** de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ser a modificação da superfície transdutora de eletrodos com rodamina 6g a responsável pela obtenção de um

3 / 3

sensor eletroquímico que poderá por ser utilizado na detecção de biomoléculas que possuam proteínas ou seus fragmentos biológicos ou sintéticos, antígenos, anticorpos, peptídeos, enzimas DNA, RNA e aptâmeros, como analitos ou como elemento de reconhecimento biológico.