

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**VALIDAÇÃO DE MARCADORES SOROLÓGICOS PARA DETECÇÃO DE ANTI-
PGL-I EM BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO**

SCARLLET DE ALMEIDA TEIXEIRA

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Biotecnologia, da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia.

UBERLÂNDIA – MG

MAIO - 2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

VALIDAÇÃO DE MARCADORES SOROLÓGICOS PARA DETECÇÃO DE ANTI-PGL-I
EM BIOSENSOR ELETROQUÍMICO

Orientadora: Profa. Dra. Isabela Maria Bernardes Goulart

Coorientadora: Dra. Fabiane Nunes Riello

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Biotecnologia, da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia.

UBERLÂNDIA – MG

MAIO - 2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

VALIDAÇÃO DE MARCADORES SOROLÓGICOS PARA DETECÇÃO DE ANTI-PGL-I
EM BIOCSENSOR ELETROQUÍMICO

SCARLETT DE ALMEIDA TEIXEIRA

Aprovado pela Banca Examinadora em: 31/05/2022

Nota: 9,0

Presidente da Banca Examinadora: Prof^ª. Dr^ª. Isabela Maria Bernardes Goulart

Assinatura:



Uberlândia, 31 de Maio de 2022

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, irmãs e amigos pelo apoio ao longo dos anos e por acreditarem em mim e sempre transmitindo apoio e confiança.

Agradeço ao Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart (*in memoriam*) pela orientação e aconselhamentos durante estes anos, com todo o seu carinho e por acreditar no meu potencial pude conseguir executar este projeto, agradeço o exemplo como grande pesquisador e por todos os valiosos conhecimentos transmitidos.

Agradeço à prof. Dr^a Isabela Maria Bernardes Goulart por todo apoio com o projeto, por sempre abrir as portas do CREDESH para as pesquisas, disponibilizar as amostras e por aceitar me orientar após a perda do nosso querido Luiz Ricardo.

Agradeço à coorientação da Dr^a. Fabiane Nunes Riello, pelo carinho, profissionalismo, dedicação, confiança, pelo incrível conhecimento, conselhos, e ajuda nos experimentos e correções da monografia.

Agradeço a todos meus amigos da B13 por todos os anos de graduação que passamos juntos, pelo companheirismo, amizade, aprendizado mútuo e pelo grande crescimento pessoal a mim proporcionados.

Agradeço a todos meus professores da graduação que contribuíram para o meu aprendizado ao longo dos anos.

Agradeço aos integrantes do Laboratório de Nanobiotecnologia que sempre me recebeu com carinho e contribuíram para execução deste estudo.

RESUMO

O diagnóstico precoce da hanseníase e o monitoramento de contatos são fundamentais para diminuir a incidência da doença. O diagnóstico atual é baseado principalmente na epidemiologia, em testes clínicos e exames dermatoneurológicos. Técnicas sorológicas e moleculares são úteis para auxiliar no diagnóstico e monitoramento, porém necessitam de tempo, mão de obra específica e ambiente laboratorial para sua realização. Sendo assim, é necessário o desenvolvimento de novas plataformas *point-of-care* para monitorar e triar indivíduos clinicamente saudáveis através da detecção de anticorpos específicos com maior rapidez, especificidade e sensibilidade. Objetiva-se neste trabalho o estudo de marcadores sorológicos para reconhecimento de anti-PGL-I em uma plataforma usando biossensor eletroquímico. Foram usados antígenos nativos e peptídeos miméticos como elemento de reconhecimento de anticorpo anti-PGL-I comercial e amostras de soro de pacientes e contatos classificados anteriormente por qPCR. As biomoléculas de reconhecimento foram adsorvidas em eletrodo *screen-printed* de grafite tratados com polímeros e a detecção de anticorpos foi analisada pelas técnicas de voltametria cíclica e de pulso diferencial, utilizando um potenciostato portátil interligado a um smartphone. O peptídeo mimético MPML-14 reconheceu o anticorpo comercial e diferenciou amostras de soro entre pacientes e contatos de forma semelhante ao antígeno nativo, sendo esta, possivelmente, a melhor biomolécula a ser utilizada como marcador sorológico na construção do biossensor para reconhecimento de anti-PGL-I. O uso desse peptídeo no biossensor trará uma nova abordagem técnica para triagem dos pacientes de forma rápida e precisa utilizando um equipamento portátil de fácil uso com maior sensibilidade, especificidade e baixo custo.

Palavras-Chave: Hanseníase; Biossensor; Eletroquímica.

Sumário

1	INTRODUÇÃO	8
1.1	Revisão da literatura.....	8
1.1.1	Hanseníase	8
1.1.2	Biossensor.....	10
1.1.3	Biossensores eletroquímicos.....	12
1.1.4	Voltametria cíclica.....	13
1.1.5	Voltametria de pulso diferencial.....	14
1.1.6	Biossensores baseados em peptídeos.....	15
2	OBJETIVOS	16
2.1	Objetivo Geral.....	16
2.2	Objetivo Específicos	16
3	JUSTIFICATIVA.....	16
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
4.1	Reagentes e soluções.....	17
4.2	Amostras biológicas	17
4.3	Eletrodos	18
4.4	Preparo do biossensor	18
4.5	Aplicação das amostras de soro e anticorpo comercial.....	18
4.6	Detecções eletroquímicas.....	20
4.7	Estatística e tratamento dos dados.....	20
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	21
6	CONCLUSÃO	25
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1. BB: *Borderline*
2. BL: *Borderline lepromatous*
3. BT: *Borderline tuberculoid*
4. Cm²: Centímetros quadrados
5. CREDESH: Centro de Referência Nacional em Hanseníase e Dermatologia sanitária
6. ELISA: *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*
7. IgM: Anticorpo de detecção Imunoglobulina M
8. IUPAC: *International Union of Pure and Applied Chemistry*
9. L: Litro
10. m: Mili
11. μ A: Microampère
12. MB: Multibacilar
13. MPML14: Peptídeo mimético de antígenos de *M. leprae*
14. mV: milivolts
15. mg: miligrama
16. μ g: micrograma
17. mL: mililitro
18. μ L: microlitro
19. mol: Unidade de quantidade de matéria
20. PB: Paucibacilar
21. PBS: *Phosphate Buffered Saline*
22. PCR: *Polimerase chain reaction*
23. PGL-1: Glicolípido Fenólico- 1
24. PGL1M3R: Peptídeo glicolípido fenólico- 1 mimético recombinante
25. pH: Potencial hidrogeniônico

26. OMS: Organização mundial de saúde
27. SPE: *Screen printed electrode*
28. SSS: *Slit skin smear*

1 INTRODUÇÃO

1.1 Revisão da literatura

1.1.1 Hanseníase

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica causada por *Mycobacterium leprae* que acomete o tecido cutâneo e nervos periféricos causando lesões na pele e neuropatia (WALKER et al., 2012). Sua parede celular é constituída, principalmente, de lipídeos e contém uma fração considerável de glicolipídeos altamente antigênicos, como o antígeno fenólico-I (PGL-I) no qual é utilizado para o sorodiagnóstico de infecções da hanseníase (BÜHRER-SÉKULA, 2008). Este micro-organismo é um bacilo álcool-ácido resistente e atua como parasita intracelular obrigatório no corpo do hospedeiro (GOULART; PENNA; CUNHA, 2002).

O bacilo *M. leprae* infecta, principalmente, macrófagos e células de Schwann e tem maior incidência nas áreas de superfície como a pele, nervos periféricos, testículos e vias aéreas superiores devido à sua temperatura necessária para a sobrevivência. Dessa forma, sua proliferação acontece entre 27 °C e 30 °C, com isso a bactéria permanece viável por 9 dias no ambiente (LASTÓRIA; DE ABREU, 2014).

O *M. leprae* foi descoberto por um médico norueguês Gerhard Henrik Armauer Hansen no final do século XIX. No Brasil, a hanseníase foi tratada durante décadas com severas políticas de isolamento compulsório a fim de extinguir a doença, as precárias condições sanitárias e a falta de conhecimentos clínicos e laboratoriais sobre a doença facilitou sua difusão (FARIA; DE SANTOS, 2015). De acordo com o boletim epidemiológico de hanseníase obtido no site do Ministério da Saúde entre os anos de 2016 e 2020, foram diagnosticados 155.359 novos casos de hanseníase no Brasil ocupando o segundo lugar entre os países com maior número de casos no mundo, atrás apenas da Índia (OMS, 2021b).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) a hanseníase pode ser classificada em duas variações clínicas distintas, paucibacilar e multibacilar, baseada na contagem do número de lesões de pele. A classificação de Ridley-Jopling separa os tipos de hanseníase conforme a carga bacilar e a imunidade celular, em duas formas polares, tuberculóide (TT) – Paucibacilar (PB) e lepromatosa (LL) – Multibacilar (MB), e um grupo instável denominado borderline, que é dividido em três subgrupos: *borderline-tuberculóide* (BT), *borderline- borderline* (BB) e *borderline-lepromatoso* (BL) (RIDLEY; JOPLING, 1966).

A classificação de pacientes com hanseníase paucibacilar (PB) é definida por apresentar baixa carga bacilar e pequenos números de lesões de pele, ou seja, é caracterizado como um paciente PB aqueles que apresentam diagnóstico baciloscópico de raspado dérmico negativo ou menos de 5 lesões cutâneas, estas ocorrem predominantemente nas extremidades comprometendo os nervos periféricos. Os pacientes com hanseníase multibacilar (MB), apresentam mais de 5 lesões cutâneas e/ou presença de bacilos álcool-acido-resistente (BAAR), apresentam alterações mais graves nos parâmetros de condução nervosa, com maior número de nervos periféricos acometidos, e infiltração cutânea difusa, especialmente orelhas, face e pavilhões auriculares, com envolvimento de órgãos internos (GASCHIGNARD et al., 2016).

A transmissão do *M. leprae* ocorre por inalação dos bacilos contidos na secreção nasal ou nas gotículas de *Flügge*, e pelo contato próximo e prolongado entre o paciente infectado e um indivíduo suscetível à infecção. A probabilidade de encontrar pacientes diagnosticados com hanseníase é quatro vezes maior quando há contato na vizinhança e até nove vezes maior quando o contato é intrafamiliar. A principal via de transmissão é a mucosa nasal, podendo ocorrer também por via sanguínea, por transmissão vertical, pelo leite materno e por picadas de insetos, a transmissão menos comum é a por erosões cutâneas (LASTÓRIA; DE ABREU, 2014).

O paciente infectado pode evoluir para uma cura espontânea, dependendo da sua capacidade de desenvolver uma resposta imune celular, ou desenvolver os sintomas clínicos da doença (GOULART; PENNA; CUNHA, 2002). A maioria dos indivíduos apresenta uma resposta imune efetiva contra a *M. leprae*, porém essa pode permanecer incubada de 2 a 4 anos, estando presente em indivíduos clinicamente saudáveis, que podem apresentar sintomas após esse período de incubação (HASTINGS et al., 1988).

O diagnóstico clínico e epidemiológico da hanseníase é realizado em exame dermatoneurológico e análise da história e condições de vida do indivíduo. Em alguns casos é feita baciloscopia, um exame complementar para poder classificar o agente causal, porém esse exame apresenta baixa sensibilidade nas formas paucibacilares (USTIANOWSKI; LOCKWOOD, 2003). O teste histopatológico é utilizado pelo método “padrão ouro”, em que se retira uma biópsia de pele de uma lesão ativa, fixada em formalina tamponada neutra, embebida em parafina e examinada por um patologista experiente. A reação de Mitsuda é um teste cutâneo, consiste na inoculação intradérmica de uma suspensão de bacilos mortos pelo calor (lepromina), Esse teste tem como objetivo avaliar o grau de resposta imune celular

caracterizada pela fagocitose dos bacilos, embora seja um teste com elevado valor prognóstico, não tem valor diagnóstico (SCOLLARD et al., 2006).

A técnica utilizada para detecção de anticorpo anti-PGL-I é o ensaio imunoenzimático (ELISA), esta contém uma ampla disponibilidade dos equipamentos necessários visto que a técnica é quase universalmente aplicável, fácil separação das fases sólido e líquido, não é necessário marcar os componentes específicos do *M. leprae* utilizados no teste (antígeno ou anticorpo), o que torna preferível para estudos epidemiológicos de grande escala e acompanhamento dos pacientes, porém é uma técnica laboriosa com limitações existentes devido às diferenças no preparo do antígenos, concentração do antígeno, soluções tamponadas, procedimentos de lavagem, diluição de soro e difícil padronização (BÜHRER-SÉKULA, 2008).

Outra técnica utilizada para diagnóstico de pacientes infectados com a *M. Leprae* e a reação quantitativa em cadeia pela polimerase em tempo real (qPCR), uma técnica de biologia molecular que permite a amplificação do DNA e quantificação à medida que a reação progride, em tempo real, gerando dados dos ciclos de replicação na qual são analisados por software, essa técnica é muito utilizada para análises de expressão genética, metilação de DNA e variantes genômicas, considerada a técnica de ouro para diagnósticos rotineiros de doenças infecciosas. para detecção de patógenos virais, fúngicos e bacterianos ou análise de biomarcadores transcricionais, como câncer e doenças mendelianas. Essa técnica usa de tecnologia para uma resposta de alta precisão e sensibilidade, mas necessita de reagentes de alto custo e mão de obra especializada. (PABINGER et al., 2014)

1.1.2 Biossensor

A IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) define um biossensor como um instrumento integrado que é capaz de fornecer uma informação analítica específica, quantitativa ou semi-quantitativa através do uso de um elemento de reconhecimento biológico (receptor bioquímico) que está em contato direto com o elemento de transdução (MEHROTRA, 2016).

Os pesquisadores Clark e Lyons desenvolveram o primeiro biossensor, criado em (1962), que utilizava uma enzima, glicose oxidase, imobilizada na superfície de um eletrodo de oxigênio, o qual detectava o consumo de oxigênio sob altos potenciais de redução, sendo classificado como eletrodo enzimático, a partir disso foram desenvolvidos diversos

biossensores com detecções diferentes como imunosensores, genossensores, entre outros (MEHROTRA, 2016).

Os biossensores podem ser aplicados em diversas áreas como médicas, biológicas, indústrias alimentícias, agrícolas, de proteção ambiental e de pesquisa farmacológica. (KŁOS-WITKOWSKA, 2016). O biossensor é composto de um eletrodo, aonde em sua superfície contém os biorreceptores, estas são biomoléculas que se ligam a um componente biológicos específico na amostra, um transdutor que por sua vez é um elemento que permite receber o sinal produzido entre o biorreceptor e a amostra convertendo em um estímulo mensurável. Por último, tem-se um sistema de processamento do sinal, que é um potenciostato responsável por amplificar e exibir os dados para serem analisados e diagnosticados como positivo ou negativo, representação esquemática na *Figura 1* (SANTOS; MHJARQUES; NUNES, 2014).

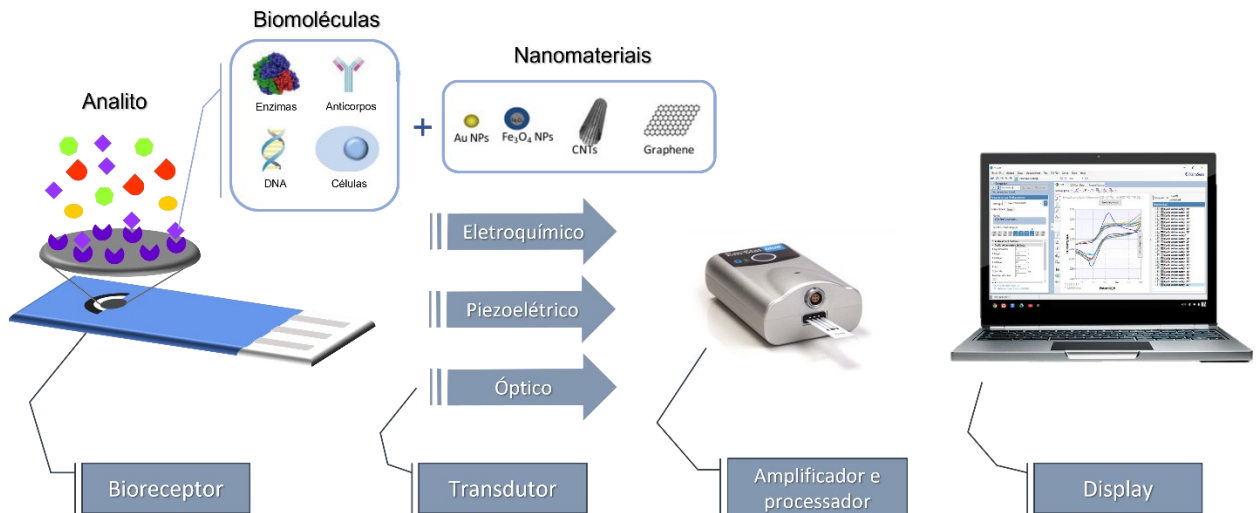


Figura 1 - Representação esquemática dos componentes de um biossensor, o analito reage com a biomolécula e nanomateriais sobre o bioreceptor aonde acontece a reação bioquímica baseada na catálise (enzimas, tecidos, células e biomoléculas miméticas) ou afinidade (anticorpos, receptores, ácidos nucleicos e biomoléculas miméticas). O produto desta interação é detectado pelos transdutores que convertem o sinal biológico em sinal mensurável, sendo estes eletroquímicos, eletrônicos, gravimétricos, magnéticos, ópticos, piezoelétricos, piroelétricos, entre outros, esse sinal é amplificado e processado por um dispositivo eletrônico, no qual passa a informação para um software na forma de gráfico. Fonte adaptada de (DRIDI et al., 2017).

Quando comparados com as técnicas de diagnóstico existentes, os biossensores apresentam diversas vantagens, dentre elas a facilidade de manipulação, baixo custo de produção, rapidez no diagnóstico, alta sensibilidade e especificidade.

A fabricação de eletrodos impressos (SPE do inglês “*screen printed electrode*”) é derivada da tecnologia de “*screen-printing*” também conhecida como impressão serigráfica, esta possibilita a fabricação de um sistema integrado contendo os eletrodos de trabalho, auxiliar,

e referência impressos em um único suporte, podendo ser um dispositivo portátil de fácil acesso e comercial, utilizado em diversos trabalhos (CHAN et al., 2016).

A utilização de nanomaterias na fabricação de biossensores têm sido o objetivo de diversas pesquisas no campo de nanotecnologia e biotecnologia, devido a essas nanoestruturas apresentarem propriedades como ótima condutividade elétrica, área superficial específica, boa estabilidade, tamanho reduzido, entre outras (LUPPA et al., 2016). Podemos citar como exemplo de nanomateriais de interesse a utilização de nanotubos de carbono, grafeno, nanofibras poliméricas, nanopartículas metálicas e magnéticas (ABBASPOUR; NOORI, 2012; ABBASPOUR et al., 2015). Esses materiais apresentam efeitos eletrocatalíticos sendo uma boa alternativa para diminuir os altos potenciais de reação em moléculas que são eletroquimicamente ativas e reque um alto potencial de oxidação/redução. Ademais estes podem contribuir para acréscimo da sensibilidade por aumentarem a área eletroativa a condutividade (CHIKKAVEERIAIAH et al., 2009).

1.1.3 Biossensores eletroquímicos

Os biossensores eletroquímicos podem ser classificados em duas categorias em relação ao componente biológico, dispositivos biocatalíticos e por afinidade, essa classificação é caracterizada de acordo com o tipo de reação biológica que ocorre entre o material de reconhecimento e o analito. Em reações biocatalíticas a presença de mediadores redox faz com que ocorra a transferência de elétrons para o eletrodo. Em dispositivos por afinidade ocorre uma reação de interação específica entre o analito e um componente biológico seletivo, esse tipo de biossensor é considerado altamente sensível e seletivo devido à alta afinidade e especificidade entre as biomoléculas e o ligante específico. Essas reações são responsáveis por produzir um sinal mensurável sendo possível a construção de um biossensor eletroquímico para a caracterização ou reconhecimento de substâncias (RAMASAMY et al., 2014).

Além da classificação biológica os biossensores eletroquímicos são sub-classificados quanto ao sinal de transdução, que correlaciona as grandezas elétricas como corrente, potência e carga, com os parâmetros químicos da solução eletroanalítica utilizada, classificados em interfaciais e não interfaciais. Os sensores interfaciais são definidos pelos fenômenos eletroquímicos que ocorrerem na superfície do sensor, ademais esse sensor pode ser dividido em estático, em que se tem ausência de corrente elétrica, como exemplo o método eletroanalítico de potenciometria. Já sensores dinâmicos são definidos pela presença de corrente

elétrica, como exemplo a voltametria, amperometria, espectroscopia de impedância e coulometria (RONKAINEN; HALSALL; HEINEMAN, 2010).

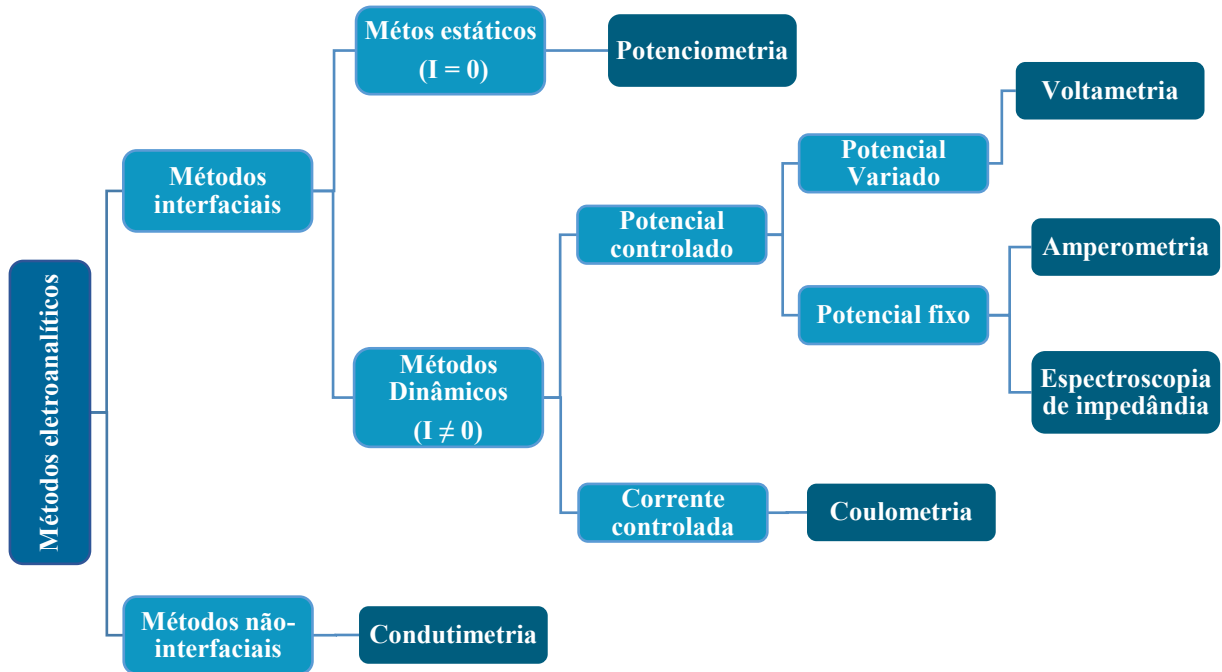


Figura 2 - Fluxograma dos métodos eletroanalíticos comuns, as condições experimentais estão representadas pela cor azul claro e as técnicas demonstradas em azul escuro. Fonte adaptada (SKOOG, 2006).

1.1.4 Voltametria cíclica

A técnica de voltametria cíclica avalia a dinâmica da transferência de elétrons de uma molécula baseada no monitoramento da corrente-resposta dentro de uma faixa de potencial, uma sequência de pulso é aplicada sobre o sistema afim de fazer uma varredura para obter um voltamograma cíclico, através dessa diferença de potencial é gerado um pico de potencial anódica (E_{pa}) e catódicas (E_{pc}), o pulso de corrente no sentido positivo para o negativo é possível monitorar correntes de redução (I_{pc}) e no sentido negativo para o positivo tem-se um pico de oxidação (I_{pa}) representados na *figura 3*. Através da amplitude pode-se obter informações sobre essa molécula, entre elas a cinética de reação de transferência de elétrons, termodinâmica de processos redox, e caso o material apresente propriedades isolantes tem-se uma menor taxa de transferência de elétrons por consequência a magnitude dos picos redox será de baixa amplitude. Esse fenômeno de redução e oxidação é monitorado na superfície do eletrodo de trabalho em contato direto com a solução condutora (FERNANDES et al., 2014).

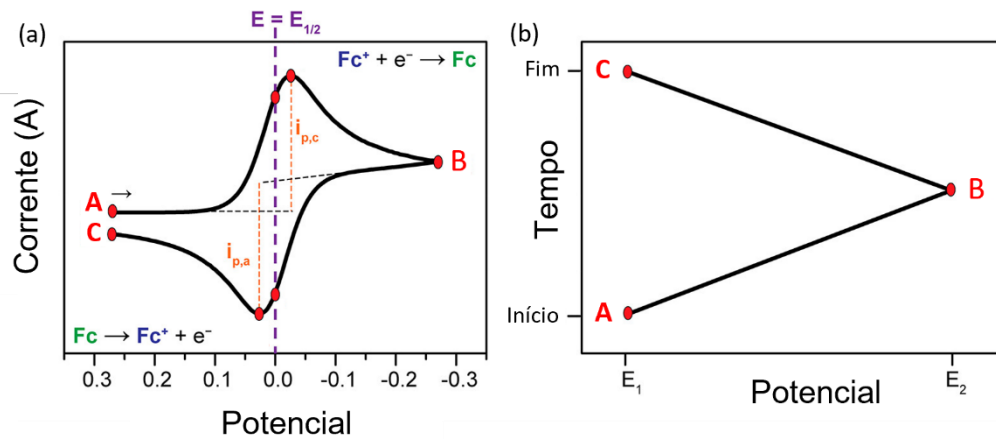


Figura 3 - (a) Voltamograma cíclico com picos redox (b) potencial triangular aplicado para gerar um voltamograma cíclico com os respectivos pontos (ELGRISHI et al., 2018).

1.1.5 Voltametria de pulso diferencial

A voltametria de pulso diferencial consiste na aplicação de pulsos em uma rampa de potencial crescente sobre o eletrodo de trabalho, nessa técnica a corrente é medida anteriormente a aplicação do pulso e no final obtendo um pulso diferencial ΔE , essa diferença das correntes é plotada em função do potencial aplicado, formando um voltamograma na forma de curva gaussiana, em que a área é diretamente proporcional à concentração do analito, representada pela *figura 4*, (PACHECO et al., 2013).

O objetivo de obter a diferença entre os dois pulsos é realizar a correção da corrente capacitiva. Ao se aplicar o pulso tem-se um acréscimo da corrente capacitiva e faradaica. A corrente capacitiva também chamada de corrente não-faradaica é a responsável pelo acúmulo ou a remoção de cargas no eletrodo e no eletrólito sem estar associada a qualquer reação química com transferência de cargas. Já a corrente faradaica está associada as reações químicas ocasionadas pela presença de espécies eletroativas com atividades redox na superfície do eletrodo. Após a aplicação do pulso a corrente capacitiva reduz exponencialmente enquanto a corrente faradaica tem uma redução linear, desta forma é mensurado a segunda leitura em um tempo apropriado para que se tenha a corrente total onde a corrente capacitiva pode ser desconsiderada. Através dessa correção a técnica de pulso diferencial permite a obtenção de limites de detecção na ordem de $10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ (PACHECO et al., 2013).

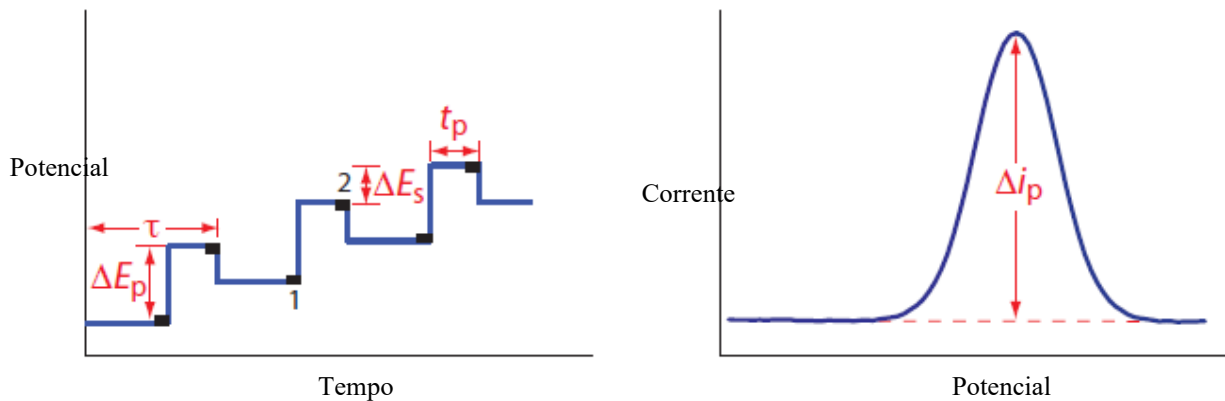


Figura 4 - Voltametria de ondas quadradas tempo/potencial para gerar a curva gaussiana. A corrente no ponto 1 é subtraída da corrente no ponto 2 resultando em uma curva Δi_p em potencial / corrente, τ = tempo de ciclo; ΔE_p = potencial de pulso fixo ou variável; ΔE_s = mudança fixa no potencial por ciclo, e t_p = tempo de pulso. Fonte adaptada (ANON, 2019).

1.1.6 Biossensores baseados em peptídeos

Peptídeos são biomoléculas contendo de dois a dezenas de resíduos de aminoácidos unidos através de uma ligação peptídica. Os aminoácidos são constituídos de um carbono α central ligada a outras quatro moléculas, sendo elas, um átomo de hidrogênio, um grupo α -amino, α -carboxílico e por fim um radical R diferente para cada aminoácido, as ligações peptídicas são formadas pela ligação do grupo α -amino de um aminoácido ao grupo α -carboxílico de outro aminoácido formando uma cadeia peptídica, a junção destas cadeias formam uma proteína (PAVAN; BERTI, 2012).

A utilização de peptídeos em biossensores tem sido empregada em razão da sua grande estabilidade, possibilidade de modificação e adição de marcadores moleculares, devido ao seu tamanho reduzido (ALBAN et al., 2014). Em virtude das limitações de obtenção de moléculas nativas, a produção de moléculas sintéticas para uso em diagnósticos tem tomado bastante espaço nas pesquisas, incluindo o uso em biossensores. É possível obter peptídeos sintéticos ou miméticos por meio de síntese química mantendo as propriedades naturais da molécula (FUJIWARA; IZUMI, 1987).

Os peptídeos miméticos de biomoléculas podem ser produzidos pela técnica de *phage display*, que consiste na expressão de peptídeos e polipeptídios na superfície de bacteriófagos filamentosos (YOUN et al., 2004). Através dessa técnica foi possível obter os peptídeos que foram utilizados neste trabalho, MPML14 (LIMA, 2015) e PGL-I M3R (YOTSUMOTO NETO et al., 2019) miméticos do antígeno nativo PGL-I de *M. leprae*.

O PGL-I é um glicolípido formado por uma extremidade lipofílica e um trissacarídeo único (SPENCER; BRENNAN, 2011), que é a região que apresenta maior antigenicidade da molécula sendo esse o maior alvo de anticorpos do tipo IgM anti-PGL-1, no qual está correlacionado com o índice baciloscópico, refletindo a carga total bacilar dos pacientes diagnosticado com hanseníase (BURGESS et al., 1988).

Em trabalhos anteriores do nosso grupo foram desenvolvidos peptídeos miméticos ao PGL-I que foram testados na técnica de ELISA para monitoramento de pacientes e contatos para auxílio de um pré-diagnóstico (LIMA, 2015).

Neste trabalho os peptídeos desenvolvidos anteriormente foram testados em biossensores eletroquímicos para detecção de anticorpos comerciais e anticorpo específico presente no soro de pacientes e contatos afim de padronizar o melhor peptídeo a ser usado neste estudo, assim como as concentrações ideais, iniciando dessa forma uma nova abordagem pioneira para o monitoramento sorológico de pacientes e contatos de hanseníase.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar e validar marcadores sorológicos (peptídeos miméticos) para reconhecimento de anti-PGL-I em uma plataforma usando biossensor eletroquímico.

2.2 Objetivo Específicos

- Funcionalizar a superfície dos eletrodos que serão utilizados;
- Padronizar a concentração de peptídeos, antígenos e anticorpos necessários para utilização no biossensor;
- Avaliar qual a melhor biomolécula a ser utilizada para detecção de anti-PGL-I comercial;
- Avaliar qual a melhor biomolécula a ser utilizada para detecção de anti-PGL-I em soro de pacientes e contatos.

3 JUSTIFICATIVA

M. leprae pode permanecer incubado durante alguns anos no organismo de um paciente clinicamente sadio, portanto, são feitos testes como ELISA utilizando antígeno para detectar anti-PGL-I no soro de pacientes e contatos de hanseníase para um monitoramento da evolução

da doença. Porém, esta técnica apresenta sensibilidade limitada e necessita de mão de obra especializada e tempo para realização. Nesse sentido, a criação de um biossensor eletroquímico possibilitará uma detecção mais efetiva do anticorpo e, com isso, auxiliará em um diagnóstico pré-clínico e prognóstico de indivíduos suscetíveis a essa patologia.

Para o desenvolvimento desse novo biossensor é necessário um estudo de quais biomoléculas serão mais apropriadas para o reconhecimento do anticorpo assim como suas concentrações e melhor método de detecção. Possibilitando, dessa forma, juntamente com outros estudos de padronizações, uma nova técnica capaz de triar pacientes e contatos de forma rápida e precisa, utilizando um equipamento portátil, de fácil manuseio, com maior sensibilidade, especificidade e baixo custo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. Para o preparo das soluções, foi utilizada água ultra purificada (resistividade $\geq 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$).

Foram utilizados reagentes segundo as especificações:

- Cloreto de potássio (KCl, Neon, P.A., A.C.S.);
- Ferricianeto de potássio ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, Fluka, P.A., A.C.S., 99,5%);
- Ferrocianeto de potássio ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, Acros Organics, P.A., 99%);

As soluções foram preparadas conforme as seguintes especificações:

- **Solução de ferro/ferricianeto de potássio (5 mmol L^{-1}), com KCl ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$):**

Pesou-se 0,75 g de KCl, 0,16 g de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ e 0,21 g de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. As massas foram transferidas para um frasco de vidro âmbar e acrescentou-se 100 mL de água ultra purificada. Em seguida foi ajustado o pH para 8.

4.2 Amostras biológicas

As amostras biológicas dos participantes da pesquisa foram obtidas no Centro de Referência Nacional em Dermatologia Sanitária e Hanseníase (CREDESH), conforme aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia sob o processo CEP/UFU No. 466/12 (Parecer CEP 960.735). Foi utilizado um pool do soro de pacientes e contatos diagnosticados com Hanseníase.

Os peptídeos miméticos M3R e MPML14 foram cedidos pela Dra. Mayara Ingrid Souza Lima (Universidade Federal do Maranhão) e o anticorpo anti-PGL-I e o antígeno PGL-I nativo foram cedidos pela BEI Resources/USA (NR-19342).

As amostras de peptídeos miméticos foram usadas nas concentrações de 1 ng/ μ L e 0,1 ng/ μ L (1:10); o antígeno nativo foi usado na concentração de 0,015 μ g/ μ L, todos os soros foram diluídos pelo fator de diluição 10^{-1} .

4.3 Eletrodos

Foram utilizados eletrodos impressos de carbono (SPCE) modelo DS110 da marca *Dropsens*, esses possuem substrato de cerâmica (33 mm x 10 mm), eletrodo de trabalho de grafite (4 mm de diâmetro), contra-eletrodo de grafite e eletrodo de referência de prata/cloreto (Ag/AgCl). Os eletrodos foram conectados ao potenciostato *palmsens 3 (Compact Electrochemical Interfaces)*, para leitura da voltametria foi utilizado o software PStTrace v5.5. Os eletrodos foram funcionalizados com matriz polimérica de PLA/PEG enriquecida com rodamina 6G aplicando três ciclos de voltametria cíclica em solução ferro/ferricianeto de potássio (5 mmol L⁻¹) em KCl (0,1 mol L⁻¹) (NOTÁRIO, 2020).

4.4 Preparo do biossensor

Inicialmente foi adsorvido sobre a área de trabalho dos eletrodos impressos de carbono (SPCE) funcionalizados o antígeno PGL-I, seja ele sintético, nativo ou mimético, e assim mantida a temperatura ambiente por 15 minutos.

4.5 Aplicação das amostras de soro e anticorpo comercial

Após o sistema SPCE funcionalizado/PGL-I completamente seco, foi aplicado o anticorpo comercial, no primeiro experimento, formando o sistema SPCE/PGL-I/Anti-PGL-I para controle positivo e para controle negativo foi utilizado água, formando o sistema SPCE/PGL-I/Água, nos experimentos subsequentes foram aplicadas amostras de soros dos pacientes contendo anticorpos anti-PGL-I para controle soro positivo, e dos contatos para controle soros negativos, a presença ou ausência de anti-PGL-I nesses soros foram confirmados anteriormente pela técnica de ELISA. Os soros foram mantidos em contato com o sistema por 15 minutos e lavados com água ultra purificada. O sistema que recebeu amostras de soro de pacientes foi identificado como SPCE/PGL-I/Soro Paciente, enquanto o que recebeu amostra de soro de controles saudáveis foi identificado como SPCE/PGL-I/Soro Contato. Após a lavagem, os sistemas foram imediatamente submetidos à detecção eletroquímica.

As figuras 5 e 6 ilustram esquematicamente as etapas de preparo do biossensor e aplicação da amostra dos soros de pacientes e contato respectivamente.

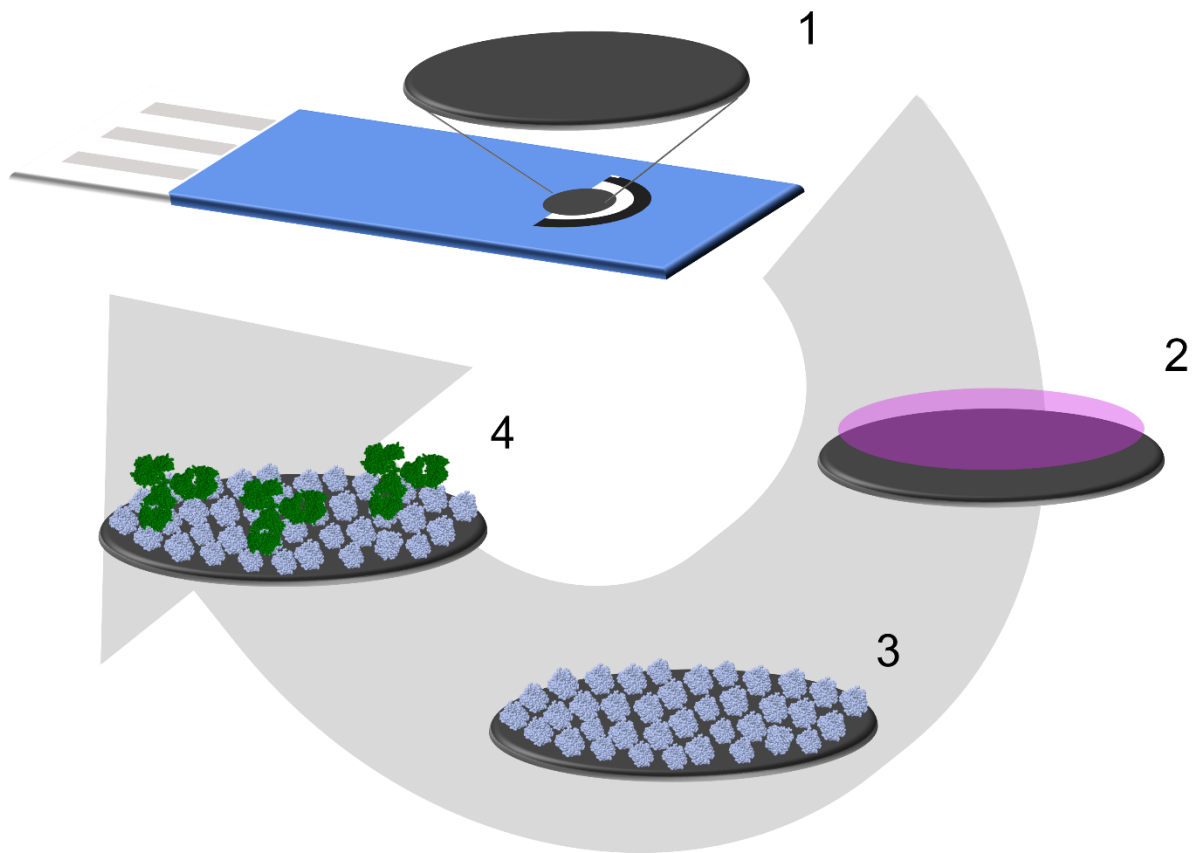


Figura 5 - Esquema ilustrativo das modificações na superfície durante as etapas de preparo do biossensor e aplicação do alvo. 1) Eletrodo impresso de carbono (SPCE) comercial sem modificações. 2) Funcionalização do eletrodo SPCE com polímeros e rodamina. 3) Imobilização do peptídeo sobre os eletrodos (SPCE/PGL-I). 4) Aplicação de amostras de soro do paciente, contendo o alvo (SPCE/PGL-I/SoroPaciente) ou do anticorpo comercial, formando o sistema SPCE/PGL-I/Anti-PGL-I, (Fonte: autoria própria).

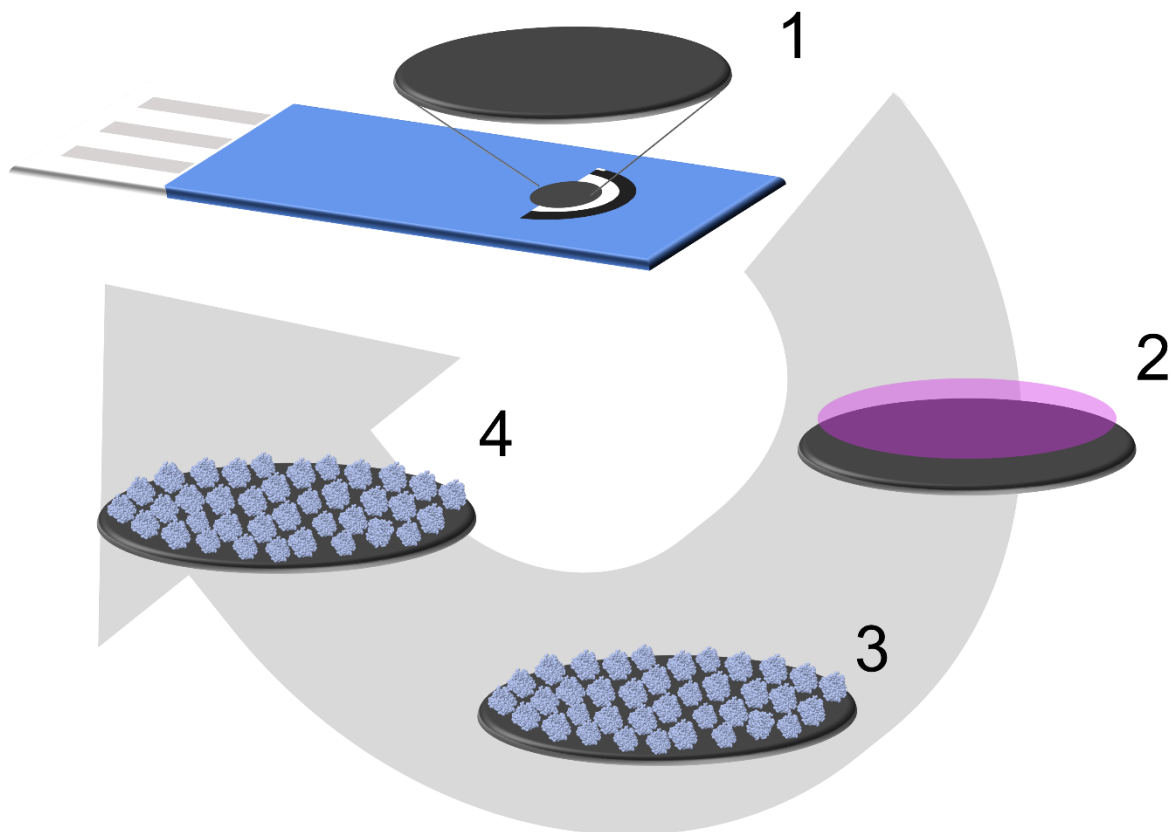


Figura 6 - Esquema ilustrativo das modificações na superfície durante as etapas de preparo do biossensor e aplicação do alvo. 1) Eletrodo impresso de carbono (SPCE) comercial sem modificações. 2) Funcionalização do eletrodo SPCE com polímeros e rodamina. 3) Imobilização do peptídeo sobre os eletrodos (SPCE/PGL-I). 4) Aplicação de amostras de soro do contato (SPCE/PGL-I/SoroContato) ou água (SPCE/PGL-I/Água), (Fonte: autoria própria).

4.6 Detecções eletroquímicas

O sistema SPCE/PGL-I/SoroPaciente, SPCE/PGL-I/SoroContato e anticorpo comercial foram submetidos à detecção eletroquímica por corrente de voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial em solução de ferro/ferricianeto de potássio (5 mmol L^{-1}) com KCl ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$). Foi aplicada uma faixa de potencial $-0,3\text{V}$ a $+0,8\text{V}$ e velocidade de varredura de 200 mV S^{-1} em voltametria cíclica e $-0,5\text{V}$ a $+0,5\text{V}$, velocidade 100mV s^{-1} para voltametria de pulso diferencial.

4.7 Estatística e tratamento dos dados

Todos os experimentos foram conduzidos em duplicata e os resultados numéricos foram apresentados no formato média aritmética \pm desvio-padrão. Os voltamogramas, foram construídos por meio do *software Origin 8*, enquanto os gráficos de barras foram construídos com o *GraphPad Prism 8*.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Para verificar qual seria o melhor marcador sorológico para o reconhecimento de Anti-PGL-I utilizando um biossensor eletroquímico, foram submetidos em detecção eletroquímica por corrente de voltametria cíclica e pulso diferencial o antígeno PGL-I nativo, e os peptídeos miméticos M3R e MPML14 usando o anticorpo Anti-PGL-I comercial, como resultado foi obtido o voltamograma representado nas *figuras 7 e 8*.

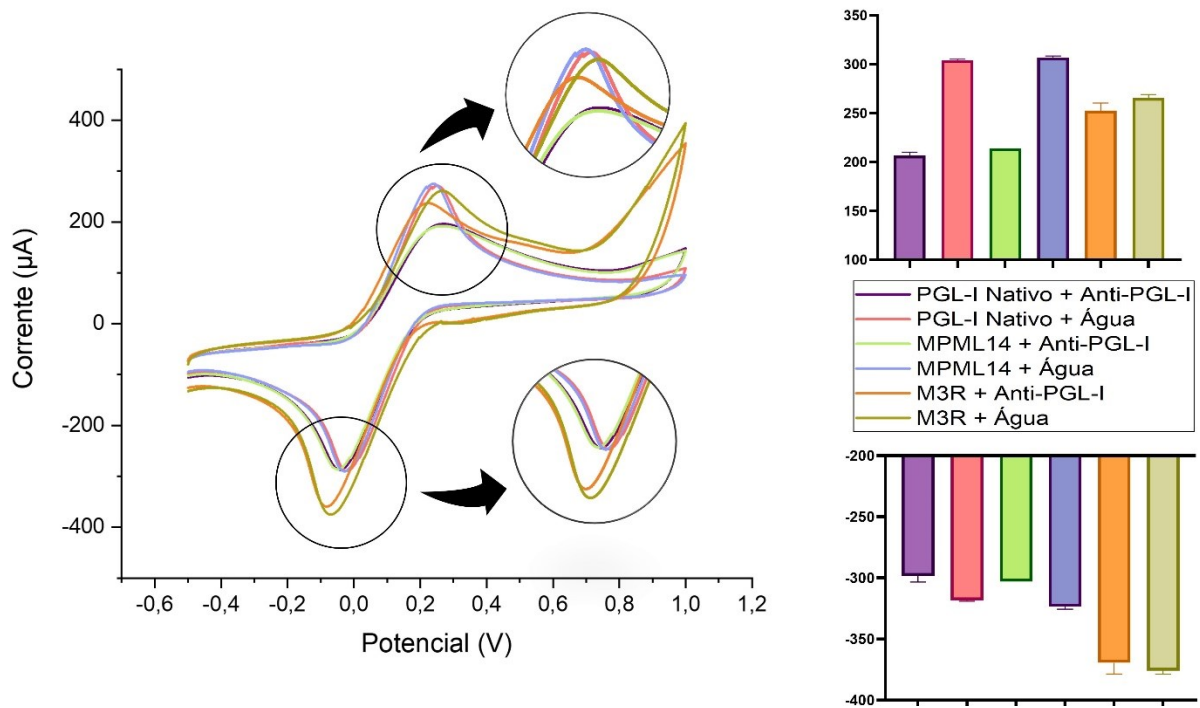


Figura 7- Voltametria cíclica em eletrodos de grafite analisados em solução aquosa contendo $K_4Fe(CN)_6 / K_3Fe(CN)_6$ ($5,00 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) e KCl ($0,10 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$); Taxa de varredura $200 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$; Representado em roxo, verde, laranja, o antígeno PGL-I nativo, e os peptídeos MPML14 e M3R + anti-PGL-I respectivamente, já as linhas em rosa, azul e bege representado respectivamente o antígeno PGL-I nativo, e os peptídeos MPML14 e M3R + água.

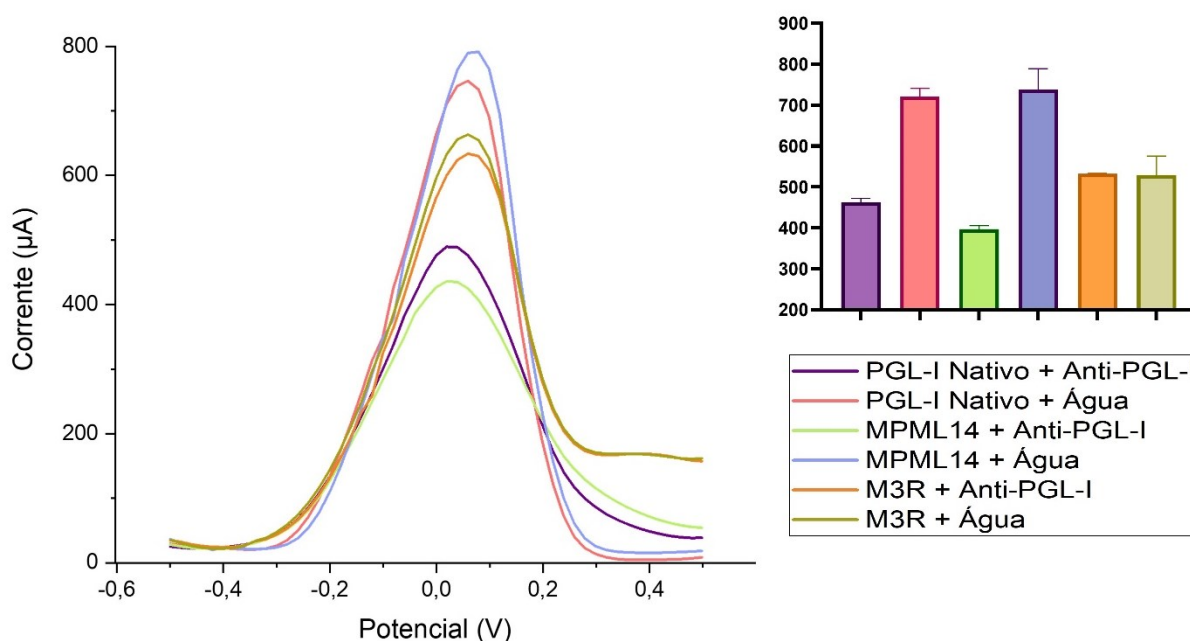


Figura 8 - Voltametria de pulso diferencial em eletrodos de grafite analisados em solução aquosa contendo $K_4Fe(CN)_6 / K_3Fe(CN)_6$ ($5,00 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) e KCl ($0,10 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$); Taxa de varredura $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$; Representado em roxo, verde, laranja, o antígeno PGL-I nativo, e os peptídeos MPML14 e M3R + anti-PGL-I respectivamente, já as linhas em rosa, azul e bege representado respectivamente o antígeno PGL-I nativo, e os peptídeos MPML14 e M3R + água.

Na detecção eletroquímica por voltametria cíclica o antígeno PGL-I nativo e o peptídeo mimético MPML14 apresentaram melhores valores de I_{pA} com diferença de $97,5 \mu\text{A}$ e $93 \mu\text{A}$ respectivamente entre o teste utilizando o anticorpo Anti-PGL-I e água. Na detecção por voltametria de pulso diferencial esses peptídeos também apresentaram melhor resultado comparados ao peptídeo M3R, na qual obteve uma diferença de $258,5 \mu\text{A}$ para o antígeno nativo e $340,5 \mu\text{A}$ para o peptídeo mimético MPML14.

Foram realizados novos testes com o peptídeo mimético M3R submetidos à detecção eletroquímica por corrente de voltametria cíclica em duas diluições, a fim de verificar se com concentrações diferentes poderia obter uma diferença entre os pacientes soropositivos e soronegativos, as concentrações foram de $1 \text{ ng}/\mu\text{L}$ e outra diluída para a concentração de $0,1 \text{ ng}/\mu\text{L}$, apresentando um voltamograma com picos redox e um gráfico de barras com as medias e desvio padrão das duplicatas, representado na *figura 9*.

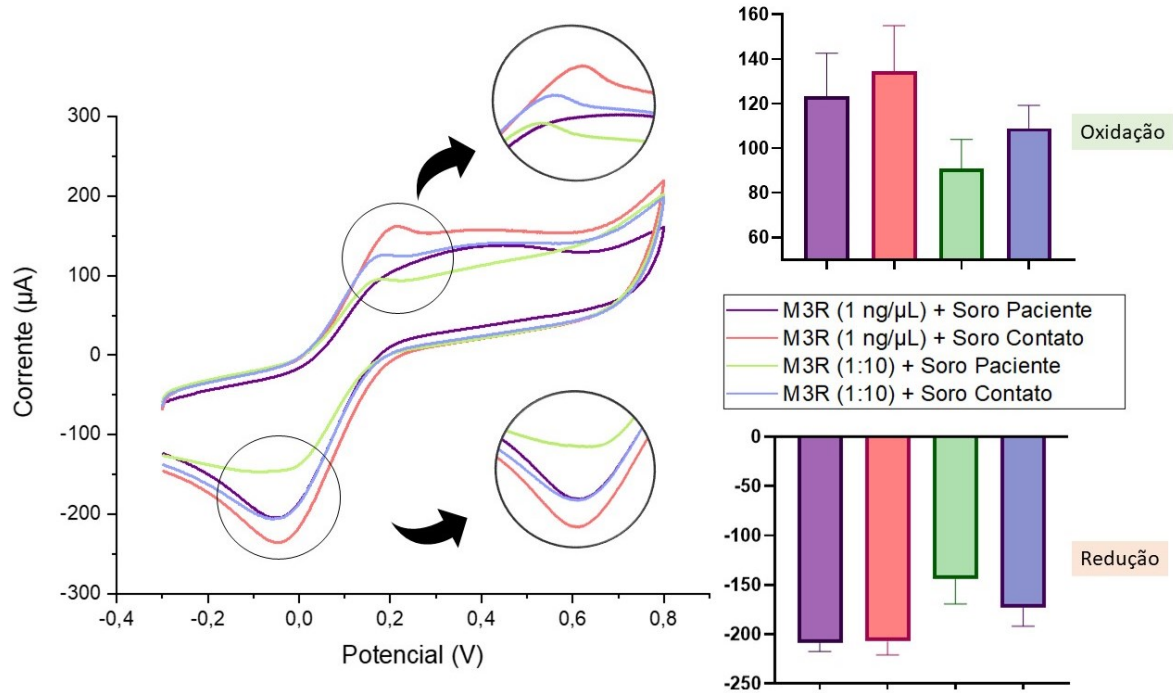


Figura 9 - Voltametria cíclica em eletrodos de grafite analisados em solução aquosa contendo $K_4Fe(CN)_6$ / $K_3Fe(CN)_6$ ($5,00 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) e KCl ($0,10 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$); Taxa de varredura $200 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$; Em roxo e rosa as linhas referentes a peptídeo mimético M3R com concentração de $1 \text{ ng}/\mu\text{L}$ dos soro de pacientes PCR positivo e contato PCR negativo respectivamente, já em verde e azul referente ao peptídeo mimético M3R com diluição de (1:10) na concentração de $0,1 \text{ ng}/\mu\text{L}$ dos soro de pacientes PCR positivo e contato PCR negativo respectivamente.

Os picos de oxidação (I_{pa}) obtiveram uma diferença entre o soro de paciente e contato de $11 \mu\text{A}$ para o peptídeo M3R com concentração de $1 \text{ ng}/\mu\text{L}$ e $18,2 \mu\text{A}$ utilizando o M3R diluído para $0,1 \text{ ng}/\mu\text{L}$, já os picos de redução (I_{pc}) apresentaram uma distinção de $1,5 \mu\text{A}$ para o peptídeo M3R com concentração de $1 \text{ ng}/\mu\text{L}$ e $29 \mu\text{A}$ utilizando o M3R diluído para $0,1 \text{ ng}/\mu\text{L}$ entre o soro de paciente e contato. Estes resultados está de acordo com o trabalho de (PARKASH et al., 2020) no qual foi possível a detecção de anticorpos IgM em soro de pacientes diagnosticados com dengue, trabalhos como (MARTINS et al., 2020) também diferenciaram anticorpos em soro de pacientes diagnosticados com leishmaniose visceral porém foi necessário a utilização de nanopartículas de ouro para obter resposta significativa, diferentemente deste trabalho no qual foi possível obter a diferenciação utilizando eletrodos de carbono

No seguinte teste foi utilizado o peptídeo mimético MPML-14 para detecção soro de pacientes e contatos de hanseníase, comparados à detecção pelo antígeno comercial PGL-I, representado nas *figuras 10 e 11*.

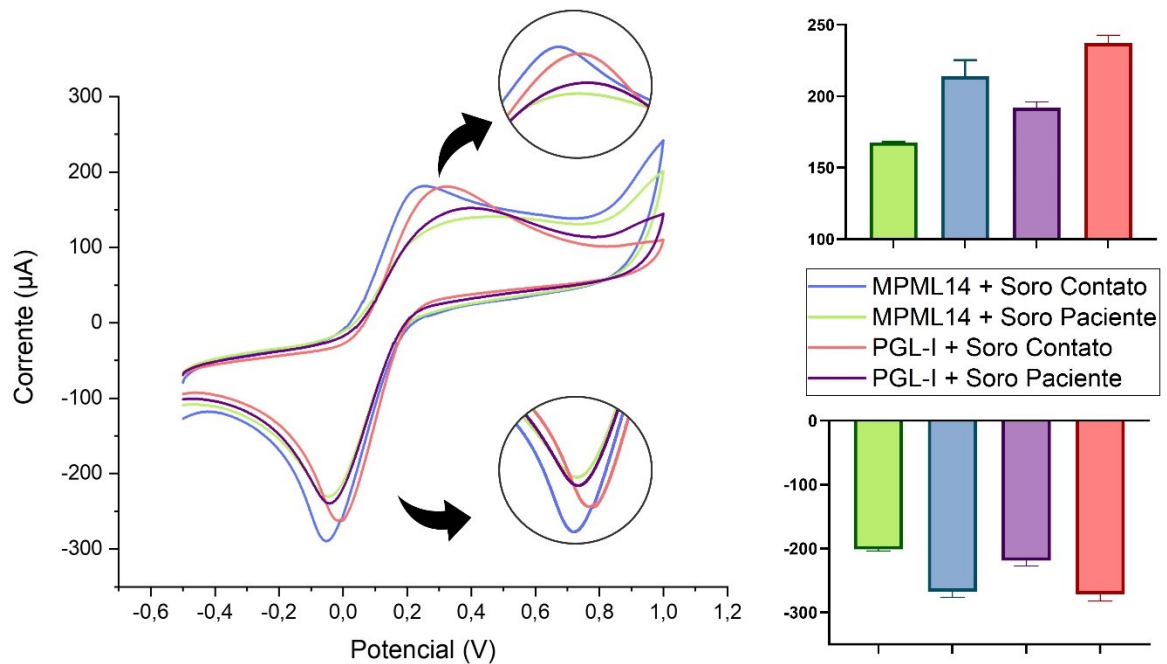


Figura 10 - Voltametria cíclica em eletrodos de grafite analisados em solução aquosa contendo $K_4Fe(CN)_6 / K_3Fe(CN)_6$ ($5,00 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) e KCl ($0,10 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$); Taxa de varredura $200 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$; Representado em verde soro de pacientes diagnosticados com hanseníase, em azul soro de contatos PCR negativo + peptídeo mimético MPML14. Em roxo soro de pacientes diagnosticados com hanseníase, e em rosa contatos PCR negativo + antígeno PGL-I

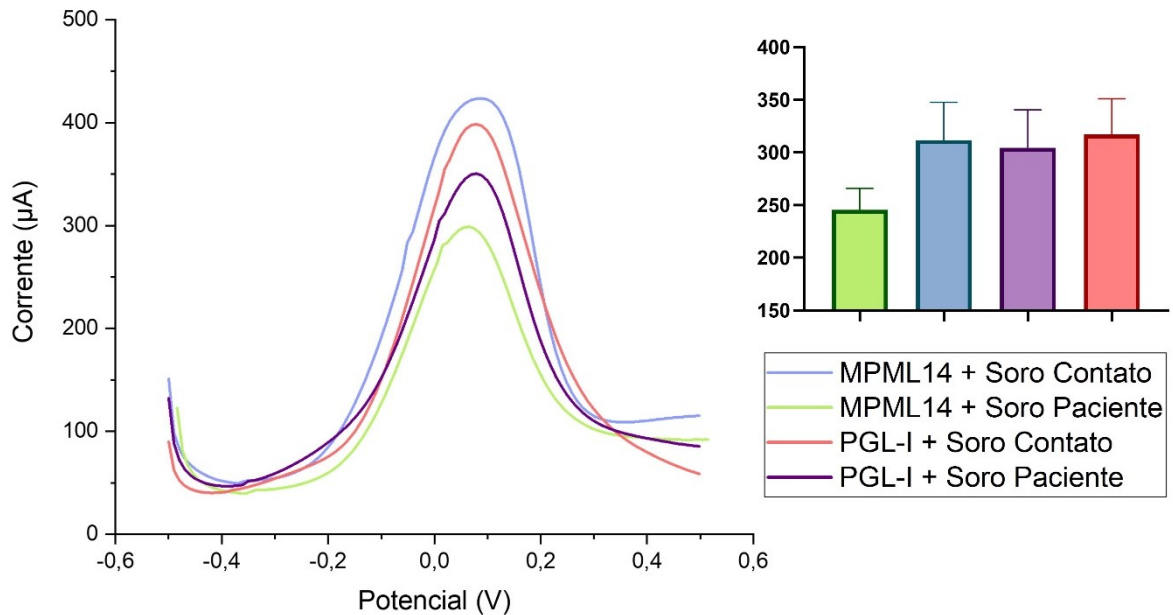


Figura 11 - Voltametria de pulso diferencial em eletrodos de grafite analisados em solução aquosa contendo $K_4Fe(CN)_6 / K_3Fe(CN)_6$ ($5,00 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) e KCl ($0,10 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$); Taxa de varredura $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$; Representado em verde soro de pacientes diagnosticados com hanseníase, em azul soro de contatos PCR negativo + peptídeo mimético MPML14. Em roxo soro de pacientes diagnosticados com hanseníase, e em rosa contatos PCR negativo + antígeno PGL-I

O teste eletroquímico de voltametria cíclica com o peptídeo mimético MPML14 apresentou uma diferença significativa de $46,5 \mu\text{A}$ entre paciente e contato no pico de oxidação

(IpA) e 66,5 μ A para IpC. As demais o desvio médio padrão entre as duplicadas no teste eletroquímico de voltametria cíclica utilizando o peptídeo mimético MPML14 obteve um menor valor (≤ 1) comparado ao desvio padrão obtido utilizando o antígeno PGL-I nativo com valor aproximado de 4,5.

Utilizando o antígeno PGL-I para teste eletroquímico de voltametria cíclica com soro de paciente e contatos também alcançou resultados com diferenças significativas, com valores de IpA entre paciente e contato com diferença de 45 μ A e 52,2 μ A no pico de redução,

Os resultados utilizando voltametria de pulso diferencial apresentou resultado semelhantes ao de voltametria cíclica, com diferença de 66 μ A entre os pacientes e contato utilizando o peptídeo mimético MPML14, já o antígeno PGL-I nativo apresentou menor diferença, com valores de 12,5 μ A entre os paciente e contatos. A técnica de voltametria de pulso diferencial apresenta maior sensibilidade comparada a de voltametria cíclica, desta forma o desvio padrão entre as duplicadas ficaram com maior valor, sendo assim necessário otimizar melhores concentrações de soro.

O diagnóstico de pacientes paucibacilares apresenta grande dificuldade devido à baixa produção de anticorpos específicos nessas formas clínicas, com isso muitas vezes são diagnosticados como soronegativo. Trabalho anterior (BÜHRER-SÉKULA et al., 2003) utiliza da técnica de tira imunocromatográfica (teste de fluxo de *M. leprae*) para classificação de pacientes recém-diagnosticados com hanseníase e identificar contatos que têm um maior risco de desenvolver hanseníase. Neste trabalho não foi possível diferenciar pacientes paucibacilares de multibacilares. Pelos resultados que obtivemos, acredita-se que é possível obter essa diferenciação usando a eletroquímica após maiores otimizações do teste como concentração e quantidade de amostras. Técnicas usando qPCR e ddPCR como no trabalho de (CHENG et al., 2019) conseguiram diferenciar pacientes paucibacilar e multibacilar em amostra de raspado.

6 CONCLUSÃO

Nesse estudo foi possível verificar alguns marcadores sorológicos que podem ser usados como alvo para reconhecimento de Anti-PGL-I em soro de pacientes e contatos para a construção de um biossensor para diagnóstico pré-clínico e prognóstico de indivíduos com hanseníase e monitoramento de contatos.

Os testes-piloto descritos neste estudo possibilitam o uso de marcadores sorológicos miméticos ao antígeno nativo PGL-I, como o MPML14, com resultados promissores para

construção de um biossensor. Este peptídeo reconheceu o anticorpo comercial e diferenciou amostras de soro entre um pool de amostras de pacientes e contatos, de forma semelhante ao antígeno nativo, sendo esta a melhor biomolécula a ser usada na construção do biossensor para reconhecimento de marcadores sorológicos. O uso de peptídeo apresenta maiores vantagens comparadas ao uso de antígenos nativos por apresentarem maior facilidade de obtenção em altas concentrações e menor custo. Além disso, o uso destes em biossensor trará uma nova abordagem técnica para triagem dos pacientes e contatos de forma rápida e precisa utilizando um equipamento portátil de fácil uso com maior sensibilidade, especificidade e baixo custo.

Os presentes experimentos deverão ser repetidos com um “N” amostral maior utilizando-se diferentes diluições dos peptídeos e soros que poderão ser objetivo de futuras investigações.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASPOUR, A. et al. Aptamer-conjugated silver nanoparticles for electrochemical dual-aptamer-based sandwich detection of staphylococcus aureus. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 68, p. 149–155, jun. 2015.

ABBASPOUR, A.; NOORI, A. Electrochemical detection of individual single nucleotide polymorphisms using monobase-modified apoferritin-encapsulated nanoparticles. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 37, n. 1, p. 11–18, ago. 2012.

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

ANON. **Voltammetric Methods**.

BÜHRER-SÉKULA, S. et al. Simple and Fast Lateral Flow Test for Classification of Leprosy Patients and Identification of Contacts with High Risk of Developing Leprosy. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 5, p. 1991–1995, maio 2003.

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**, v. 101, n. 1, p. 159–171, 15 ago. 1988.

CHAN, K. F. et al. Fabrication of graphene/gold-modified screen-printed electrode for detection of carcinoembryonic antigen. **Materials Science and Engineering: C**, v. 58, p. 666–674, jan. 2016.

CHENG, X. et al. Development and evaluation of a droplet digital PCR assay for the diagnosis of paucibacillary leprosy in skin biopsy specimens. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 3, p. e0007284, 18 mar. 2019.

CHIKKAVEERIAIAH, B. V. et al. Single-Wall Carbon Nanotube Forest Arrays for Immunochemical Measurement of Four Protein Biomarkers for Prostate Cancer. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 21, p. 9129–9134, 1 nov. 2009.

CLARK, L. C.; LYONS, C. ELECTRODE SYSTEMS FOR CONTINUOUS MONITORING IN CARDIOVASCULAR SURGERY. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 102, n. 1, p. 29–45, 15 dez. 2006.

DRIDI, F. et al. Nanomaterial-based electrochemical biosensors for food safety and quality assessment. In: **Nanobiosensors**. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 167–204.

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

FERNANDES, K. H. A. A. et al. TECHNICAL CONSIDERATIONS REGARDING THE USE OF STAIRCASE SWEEP VOLTAMMETRY. **Química Nova**, 2014.

FUJIWARA, T.; IZUMI, S. Synthesis of the Neoglycoconjugates of Phenolic Glycolipid-related Trisaccharides for the Serodiagnosis of Leprosy. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 51, n. 9, p. 2539–2547, 6 set. 1987.

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

LIMA, M. **Desenvolvimento de peptídeos miméticos de antígenos do M. leprae e implicações no diagnóstico e prognóstico da hanseníase**. [s.l: s.n.].

LUPPA, P. B. et al. Clinically relevant analytical techniques, organizational concepts for application and future perspectives of point-of-care testing. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 3, p. 139–160, maio 2016.

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

NOTÁRIO, A. **Modificações de eletrodos com nanomateriais para detecção de infarto agudo do miocárdio em biossensor eletroquímico**. [s.l.] Universidade Federal de Uberlândia, 24 jul. 2020.

PABINGER, S. et al. A survey of tools for the analysis of quantitative PCR (qPCR) data. **Biomolecular Detection and Quantification**, v. 1, n. 1, p. 23–33, set. 2014.

PACHECO, W. F. et al. Voltammetry: A Brief Review About Concepts. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 4, 2013.

PARKASH, O. et al. Development and Evaluation of an Electrochemical Biosensor for Detection of Dengue-Specific IgM Antibody in Serum Samples. **Diagnostics**, v. 11, n. 1, p. 33, 26 dez. 2020.

PAVAN, S.; BERTI, F. Short peptides as biosensor transducers. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 402, n. 10, p. 3055–3070, 15 abr. 2012.

RAMASAMY, R. et al. Biosensors in clinical chemistry: An overview. **Advanced Biomedical Research**, v. 3, n. 1, p. 67, 2014.

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

RONKAINEN, N. J.; HALSALL, H. B.; HEINEMAN, W. R. Electrochemical biosensors. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 5, p. 1747, 2010.

SKOOG, D. A. H. F. J.; N. T. A. **Princípios de Análise Instrumental**. 5. ed. Porto Alegre: [s.n.].

SPENCER, J. S.; BRENNAN, P. J. The role of Mycobacterium leprae phenolic glycolipid I (PGL-I) in serodiagnosis and in the pathogenesis of leprosy. **Leprosy review**, v. 82, n. 4, p. 344–57, dez. 2011.

YOTSUMOTO NETO, S. et al. Immunodiagnostic of leprosy exploiting a photoelectrochemical platform based on a recombinant peptide mimetic of a Mycobacterium leprae antigen. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 143, p. 111625, out. 2019.

YOUN, J. H. et al. Production and characterization of peptide mimotopes of phenolic glycolipid-I of *Mycobacterium leprae*. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 51–57, maio 2004.